

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011306

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/56, C12N5/10, C12P19/04, A01H5/00, C08B37/08, A61K31/728

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/56, C12N5/10, C12P19/04, A01H5/00, C08B37/08, A61K31/728

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Graves M.V. et al., Hyaluronan synthesis in virus PBCV-1-infected chlorella-like green algae, Virology, 1999, Vol.257, No.1, pages 15 to 23	20 1-19
X Y	DeAngelis P.L. et al., Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1, Science, 1997, Vol.278, No.5344, pages 1800-3	20 1-19
Y	JP 2001-521741 A (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA), 13 November, 2001 (13.11.01)	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 September, 2004 (29.09.04)Date of mailing of the international search report  
12 October, 2004 (12.10.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/011306

**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐ in written format

☒ in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐ contained in the international application as filed

☒ filed together with the international application in computer readable form

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011306

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011306

Claims 1, 3, 6 to 8, 14, 16 and 18 relate to a method of producing hyaluronic acid by transforming a plant cell with the use of a vector containing a DNA encoding hyaluronate synthase and then growing the plant cell; claims 2, 4 to 5, 9 to 13, 15, 17 and 19 relate to a method of producing hyaluronic acid by transforming a plant with the use of a vector containing a DNA encoding hyaluronate synthase and then growing the plant; and claim 20 relates to hyaluronic acid.

As the results of the search, however, it is found out that "a method of producing hyaluronic acid by transforming a host with the use of a vector containing a DNA encoding hyaluronate synthase and then growing the host" is not novel because of having been reported in document 'JP 2001-521741 A (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA) 13 November, 2001 (13.11.01), Claims 39 to 41'.

As a result, "a method of producing hyaluronic acid by transforming a host with the use of a vector containing a DNA encoding hyaluronate synthase and then growing the host" falls within the category of prior art and, therefore, the above common matter cannot be referred to as a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2.

Thus, there is no matter common to all claims.

Since there is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy in the meaning within PCT Rule 13 can be found out among these groups of inventions differing from each other.

Such being the case, it is obvious that claims 1 to 20 do not comply with the requirement of unity of invention.



## Hyaluronan Synthesis in Virus PBCV-1-Infected Chlorella-like Green Algae<sup>1</sup>

Michael V. Graves,\* Dwight E. Burbank,\* Robyn Roth,† John Heuser,† Paul L. DeAngelis,‡ and James L. Van Etten\*<sup>2</sup>

\*Department of Plant Pathology, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska 68583-0722; †Department of Cell Biology and Physiology, Washington University Medical School, St. Louis, Missouri 63130; and ‡Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma 73190

Received January 14, 1999; returned to author for revision January 20, 1999; accepted February 1, 1999

We previously reported that the chlorella virus PBCV-1 genome encodes an authentic, membrane-associated glycosyltransferase, hyaluronan synthase (HAS). Hyaluronan, a linear polysaccharide chain composed of alternating  $\beta$ 1,4-glucuronic acid and  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosamine groups, is present in vertebrates as well as a few pathogenic bacteria. Studies of infected cells show that the transcription of the PBCV-1 *has* gene begins within 10 min of virus infection and ends at 60–90 min postinfection. The hyaluronan polysaccharide begins to accumulate as hyaluronan-lyase sensitive, hair-like fibers on the outside of the chlorella cell wall by 15–30 min postinfection; by 240 min postinfection, the infected cells are coated with a dense fibrous network. This hyaluronan slightly reduces attachment of a second chlorella virus to the infected algae. An analysis of 41 additional chlorella viruses indicates that many, but not all, produce hyaluronan during infection. © 1999

Academic Press

**Key Words:** glycosyltransferase; hyaluronan synthase; dsDNA virus; PBCV-1; chlorella virus; Phycodnaviridae.

### INTRODUCTION

Hyaluronan, also called hyaluronic acid, is the least complex member of the glycosaminoglycan family, which also includes heparin, heparan sulfate, chondroitin, and keratan sulfate. The latter members of this family are highly sulfated and typically exist as a proteoglycan (i.e., covalently attached to a core protein). Hyaluronan, however, is a simple linear polysaccharide chain composed of alternating  $\beta$ 1,4-glucuronic acid (GlcA) and  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosamine (GlcNAc) moieties that can reach molecular masses of up to  $10^7$  kDa (~25,000 disaccharides) (Hascall *et al.*, 1994; Laurent and Fraser, 1992). Hyaluronan is a ubiquitous constituent of the extracellular matrix, particularly of soft connective tissues in vertebrates (Laurent and Fraser, 1992). Hyaluronan interacts with proteins such as CD44 (Aruffo *et al.*, 1990; Culty *et al.*, 1990; Miyake *et al.*, 1990), RHAMM (Hall *et al.*, 1995; Hardwick *et al.*, 1992), and BEHAB (Jaworski *et al.*, 1994). Consequently, this polysaccharide influences the growth and migration of cells in such diverse processes as embryonic development (Tools, 1991), oocyte maturation (Salustri *et al.*, 1990), angiogenesis, wound healing (West *et al.*, 1985), and tumor progression (Sherman *et al.*, 1994). In contrast to other glycosaminoglycans, which are assembled as they traverse the endoplasmic reticulum and

the Golgi stacks, hyaluronan is synthesized by an enzyme located on the inner surface of the plasma membrane (Philipson and Schwartz, 1984). Hyaluronan synthase (HAS) adds sugar residues from UDP-GlcA and UDP-GlcNAc. In animal cells, hyaluronan is transferred to the pericellular space.

Extracellular capsules of a few pathogenic bacteria such as group A and C *Streptococcus* spp. and *Pasteurella multocida* also contain hyaluronan (Carter and Annau, 1953; Kass and Seastone, 1944). Because hyaluronan, a host component, is not normally immunogenic, the capsule serves as a molecular camouflage protecting the microbes from phagocytosis and complement fixation during infection (Husmann *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1996).

While sequencing the 330,740-bp genome of the algal virus PBCV-1 (Kutish *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996, 1997; Lu *et al.*, 1995, 1996), we discovered that this virus contains an open reading frame (ORF) (A98R) that encodes a protein with similarity to both vertebrate and bacterial HAS enzymes. The PBCV-1 *has* gene was expressed in *Escherichia coli*, and the recombinant protein was an authentic, membrane-associated HAS (DeAngelis *et al.*, 1997). Landstein *et al.* (1998) demonstrated that PBCV-1 encoded two other enzymes, glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT, ORF A100R) and UDP-glucose dehydrogenase (UDP-GlcDH, ORF A609L), that produce sugar precursors (glucosamine-6-phosphate and UDP-glucuronic acid, respectively) required for hyaluronan synthesis. In the current work, we monitor the expres-

<sup>1</sup> This manuscript has been assigned Journal Series No. 12512; Agricultural Research Division, University of Nebraska.

<sup>2</sup> To whom reprint requests should be addressed. Fax: (402) 472-2853. E-mail: [vanetten@biocomp.unl.edu](mailto:vanetten@biocomp.unl.edu).



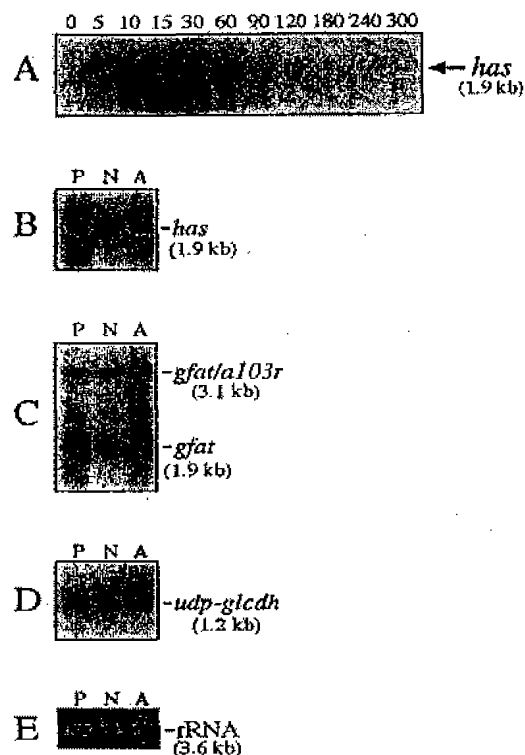


FIG. 1. Northern blot analysis of the accumulation of *has*, *gfat*, and *udp-glc4h* mRNAs during virus PBCV-1 infection. (A) RNAs isolated from uninfected (lane 0) and from PBCV-1-infected chlorella cells at 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, and 300 min p.i. The blot was probed with the PBCV-1 *has* gene. (B–D) RNAs isolated from cells at 30 min after infection with viruses PBCV-1, NC-1C, or AL-2C (lanes P, N, and A, respectively). The membranes were probed with either the PBCV-1 *has* gene (B), *gfat* gene (*g100r*) (C), or *udp-glc4h* gene (*g609f*) (D). The filter in panel E was stained with ethidium bromide and shows the 3.6-kb rRNA used to correct for loading differences between the samples.

sion of the *has* gene and the production and localization of hyaluronan in PBCV-1-infected chlorella.

## RESULTS

### The *has* gene expression during PBCV-1 replication

Total RNA was isolated from chlorella cells at various times after PBCV-1 infection and hybridized to the viral *has* gene. A single, ~1900-nucleotide transcript, a size sufficient to encode a protein of 567 amino acids, appeared within 5–10 min postinfection (p.i.), peaked at 30 min p.i., and disappeared at 60–90 min p.i. (Fig. 1A). Because PBCV-1 DNA synthesis begins ~60 min p.i. (Van Etten *et al.*, 1984), the *has* gene is an early gene. This is consistent with our previous finding that HAS enzyme activity was detected in chlorella cells at 50 and 90 min p.i. (DeAngelis *et al.*, 1997).

### Hyaluronan is localized on the surface of PBCV-1-infected chlorella

Typically, HASs are integral membrane-bound proteins, and the newly synthesized hyaluronan is secreted across the membrane to the extracellular matrix (Philipson and Schwartz, 1984). Previous experiments established that the PBCV-1-encoded HAS is associated with the membrane fraction of PBCV-1-infected chlorella cells (DeAngelis *et al.*, 1997). Therefore, we looked for hyaluronan on the surface of infected chlorella by monitoring the ability of a  $^{125}$ I-labeled hyaluronan-binding protein ( $^{125}$ I-HABP) to interact with intact, virus-infected cells (Tengblad, 1980). This protein did not attach to uninfected cells, indicating that the cell surface lacked hyaluronan. By 15 min p.i., small but significant amounts of the  $^{125}$ I-HABP bound to the infected cells, indicating the presence of surface hyaluronan. During the first 90 min p.i., the level of  $^{125}$ I-HABP bound to the infected cells increased slightly and then increased rapidly during the next 120–150 min (Fig. 2). Treatment of infected chlorella cells at 240 min p.i. with hyaluronan-lyase, before the addition of  $^{125}$ I-HABP, reduced attachment of the binding protein to the level of infected cells at 15 min p.i. (Fig. 2). The absolute specificity of the HABP and the hyaluronan-lyase for hyaluronan establish the presence of hyaluronan on the infected cell surface.

To determine whether the hyaluronan is localized to a specific area of the cell wall or is present over the entire cell surface, hyaluronan accumulation was also monitored by fluorescent microscopy using biotinylated-hyaluronan binding protein (bt-HABP) in conjunction with an avidin-FITC conjugate. As shown in Fig. 3A, many infected cells developed a uniform green fluorescence over the entire cell surface by 30 min p.i.; uninfected cells autofluoresced orange-red. The intensity of green fluorescence as well as the number of fluorescing cells increased up to 240 min p.i. Treatment of cells at 240 min p.i. with hyaluronan-lyase, before the addition of bt-HABP, abolished most of the green fluorescence (Fig. 3A).

### Ultrastructural changes in the cell wall of PBCV-1-infected chlorella cells

The cell walls of uninfected and PBCV-1-infected cells were also examined by quick-freeze deep-etch electron microscopy. As shown in Fig. 3B, the exterior surface of the infected chlorella cell wall takes on a "hairy" appearance; by 240 min p.i., the infected cell is covered with a highly developed, dense fibrous network. Incubation of cells with hyaluronan-lyase removes this "hairy" material, indicating that this fibrous network is composed of hyaluronan (Fig. 3B).

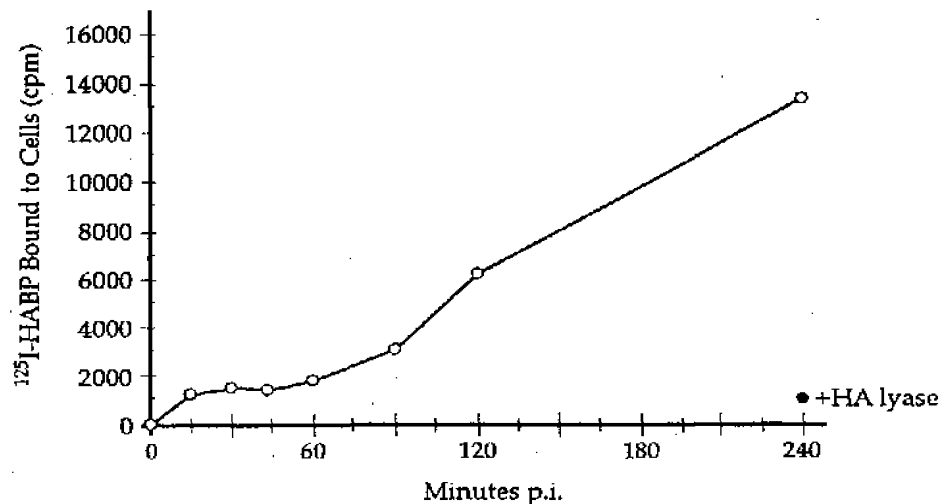


FIG. 2. Hyaluronan accumulation on the surface of PBCV-1 infected algae. Uninfected and infected cells were incubated with <sup>125</sup>I-HABP as described in Materials and Methods. One sample from infected cells at 240 min p.i. was treated with hyaluronan-lyase before the addition of the HABP. The results represent the average of two separate experiments.

#### Hyaluronan partially blocks chlorella virus attachment

The results of the preceding experiments indicate that the external surface of the chlorella cell wall changes dramatically after PBCV-1 infection as the result of hyaluronan accumulation. To determine whether surface hyaluronan prevents attachment of a second virus to PBCV-1-infected cells, we monitored the ability of an antigenic variant of PBCV-1 [named P31 (Wang *et al.*, 1993)] to attach to chlorella cells at various times after PBCV-1 infection. As shown in Table 1, prior PBCV-1 infection of chlorella reduces P31 attachment to the alga by ~50% at 120–300 min p.i. Treatment of the 180-min PBCV-1-infected cells with hyaluronan-lyase before the addition of P31 slightly increased the ability of P31 to attach to the cells (Table 1). Therefore, surface hyaluronan accumulation slightly reduces subsequent virus attachment, albeit late in the infection cycle.

#### The *has* gene is widespread in the chlorella viruses

To determine whether the *has* gene is widespread among the chlorella viruses, the *has* gene probe used in Fig. 1 was hybridized to DNA from 41 other viruses isolated from diverse geographical regions (Fig. 4). These viruses infect either *Chlorella* NC64A or *Chlorella* Pbi. Chlorella cells infected with each of the viruses were also monitored for extracellular hyaluronan with the <sup>125</sup>I-HABP (radioactive counts are also listed in Fig. 4). These experiments produced the following results. (1) The PBCV-1 *has* gene probe did not hybridize to host *Chlorella* NC64A DNA. (2) The PBCV-1 *has* gene probe hybridized to some degree to 28 of the 37 DNAs from viruses (including PBCV-1) that infect *Chlorella* NC64A (NC64A viruses). (3) All except one of these 28 NC64A viruses

produced extracellular hyaluronan. The exception was NY-2A, which hybridized weakly with the *has* gene. (4) Nine of the 37 NC64A viruses, CA-1A, CA-2A, IL-2A, IL-2B, IL-3A, IL-3D, SC-1A, SC-1B, and IL-5-2s1, neither hybridized with the *has* gene probe nor produced extracellular hyaluronan. (5) None of the DNAs from the five viruses, CVA-1, CVB-1, CVG-1, CVM-1, and CVR-1, that infect *Chlorella* strain Pbi (Pbi viruses) (Reisser *et al.*, 1988) hybridized with the PBCV-1 *has* gene probe. However, 2 of the 5 Pbi viruses, CVG-1 (Fig. 3C) and CVR-1, produced extracellular hyaluronan (Fig. 4). Presumably, these 2 Pbi viruses encode a *has* gene that has diverged substantially from the PBCV-1 gene.

These experiments indicate that *has* gene expression is not essential for chlorella virus growth because 10 of the NC64A viruses and 3 of the Pbi viruses do not produce detectable extracellular hyaluronan. One explanation is that these viruses encode an enzyme or enzymes that produce another polysaccharide on the external surface of the infected chlorella cells. However, two experiments indicate that this possibility is unlikely. (1) The surface of chlorella cells infected with Pbi virus CVA-1 (no <sup>125</sup>I-HABP binding; Fig. 4) does not appear "hairy" on electron microscopy at 240 min p.i. (Fig. 3C). (2) Cells infected with virus IL-3A were also monitored for changes in attachment of a second virus; only a slight reduction in attachment occurred (results not shown).

#### Analysis of *has* gene sequence and expression from other chlorella viruses

Ten of the 41 chlorella viruses, plus PBCV-1, were chosen for further analysis of the *has* gene. The *has* gene from each was amplified by PCR using primers that

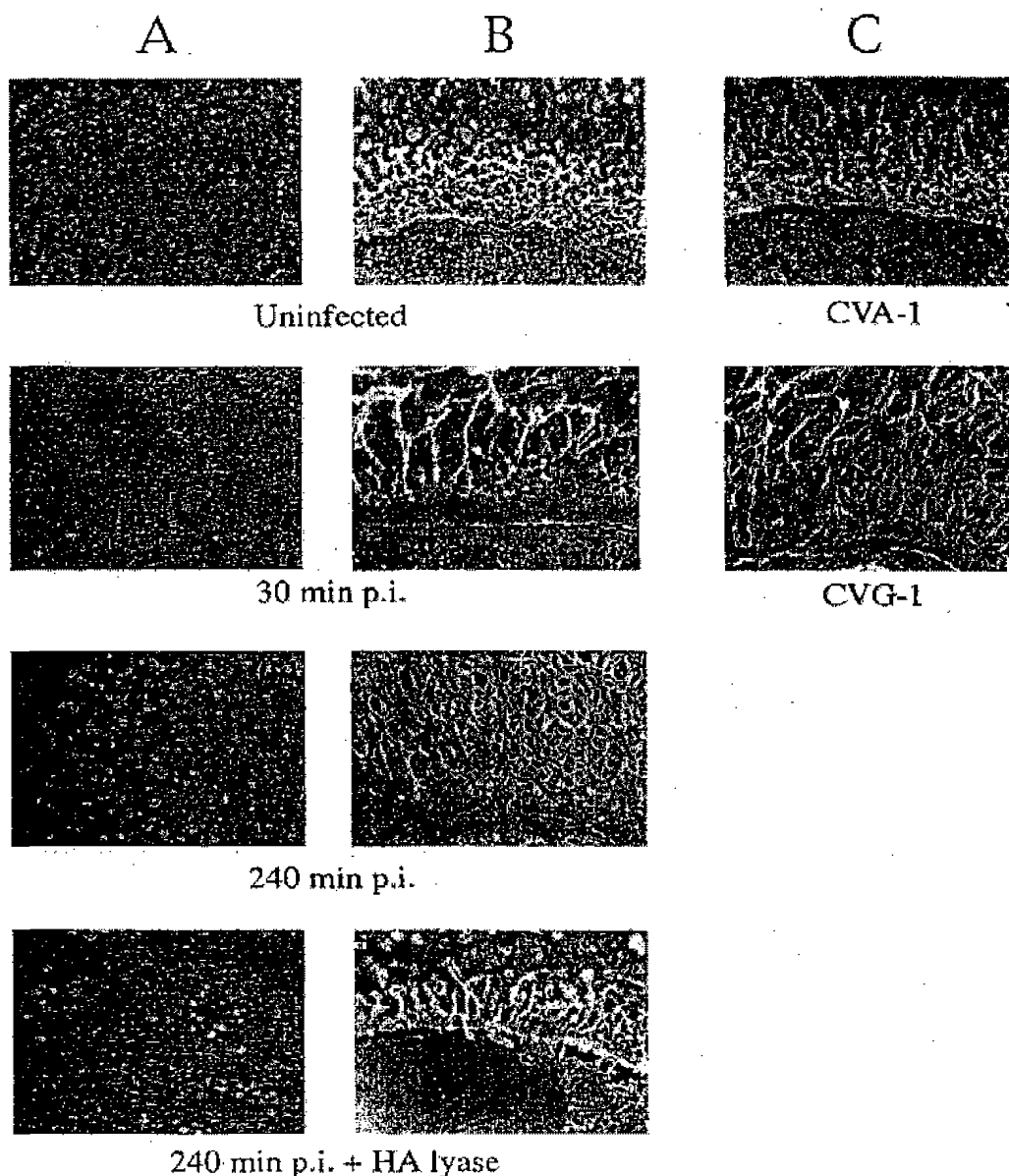


FIG. 3. Localization of hyaluronan on the surface of infected cells and ultrastructural changes in the algal cell wall after viral infection. Detection of hyaluronan on the surface of uninfected *Chlorella* NC64A cells and PBCV-1-infected cells at 30 and 240 min p.i. using a bt-HABP in combination with an avidin-FITC conjugate (A) or by quick-freeze deep-etch electron microscopy (B). A sample of PBCV-1-infected cells at 240 min p.i. was treated with hyaluronan-lyase before the fluorescent labeling or electron microscopic examination. Note the bright green fluorescence and accumulation of a dense, fibrous network on the surface of PBCV-1-infected cells at 240 min p.i. (C) *Chlorella* Pbi cells infected with viruses CVA-1 or CVG-1 examined by quick-freeze, deep-etch electron microscopy. Both samples were taken at 240 min p.i. Note the surface of the CVA-1-infected cells resemble uninfected *Chlorella* NC64A cells as contrasted to the surface of CVG-1- and PBCV-1-infected cells.

correspond to the 5' and 3' ends of the PBCV-1 *has* gene (DeAngelis *et al.*, 1997). The primers produced the expected 1.7-kb product from virus PBCV-1 DNA and five additional virus DNAs, NC-1C, AL-2C, MA-1E, CA-4A, and XZ-5C (Fig. 5). No PCR product was obtained with SC-1A, MA-1D, NY-2B, NY-2A, and CVG-1 DNAs. These results support the data in Fig. 4; PCR products were produced only from virus DNAs that hybridized strongly to the

PBCV-1 *has* gene probe. The six different 1.7-kb PCR products (including PBCV-1) were cloned and sequenced; analyses of the sequences led to the following conclusions. (1) All the clones (including PBCV-1) contained a G instead of an A at position 52285 in the original PBCV-1 genomic sequence (Li *et al.*, 1995), indicating an error in the published PBCV-1 sequence. Correction of this base changes an Asp residue to a Gly at

TABLE 1

Attachment of Virus P31 (an Antigenic Variant of PBCV-1)  
to PBCV-1-Infected *Chlorella* NC64A

Time after PBCV-1 infection (min)	Percentage of unattached P31*
15	19 ± 8
60	28 ± 8
120	36 ± 7
180	40 ± 3
240	34 ± 8
300	32 ± 8
180 + HA-lyase	29 ± 10

\* Average of three separate experiments.

amino acid 462. This change is significant because all other eukaryotic HASs have a Gly in this position (DeAngelis *et al.*, 1997). (2) The sequence of the AL-2C clone was identical to the corrected PBCV-1 sequence. (3) The

ISOLATE	HOST	<sup>125</sup> I-HABP Binding at 240 min p.i. (cpm)	ISOLATE
		0 16672	NY-1
	NE-8D	7628 1013	IL-5-2a1
	NY-1	10907 14657	AL-2A
	CA-4B	9032 8263	MA-1D
	AL-1A	10973 10786	NY-2B
	NY-2C	14876 14778	CA-4A
	NC-1D	9793 571	NY-2A
	PBCV-1	14549 9688	XZ-3A
	NC-1C	15438 11922	SH-6A
	CA-1A	293 9457	IL-2C
	CA-2A	232 16585	XZ-6E
	IL-2A	471 12287	XZ-4C
	IL-2B	305 14895	XZ-5C
	IL-3A	84 16514	XZ-4A
	IL-3D	903 49	CVA-1
	SC-1A	448 193	CVB-1
	SC-1B	56 4440	CVG-1
	NC-1A	11528 303	CVM-1
	NE-8A	11176 1846	CVR-1
	AL-2C	14586	
	MA-1E	10266	
	NY-2F	12801	
	CA-1D	10887	
	NC-1B	15258	

FIG. 4. Hybridization of the PBCV-1 *has* gene to DNA isolated from *Chlorella* NC64A and from 37 NC64A viruses and 5 Pbi viruses (CVA-1, CVB-1, CVG-1, CVM-1, and CVR-1). The blots contain 1, 0.5, 0.25, and 0.12 µg of DNA (left to right, respectively). The accumulation of hyaluronan on the surface of the infected cells, as measured by the ability of <sup>125</sup>I-HABP to attach to the cells at 240 min p.i., is also indicated for each virus. The labeling results represent the average of at least two separate experiments. Because viruses SC-1A and NY-2A replicate slower than the other viruses, they were analyzed for hyaluronan accumulation at 8 h p.i. (\*).

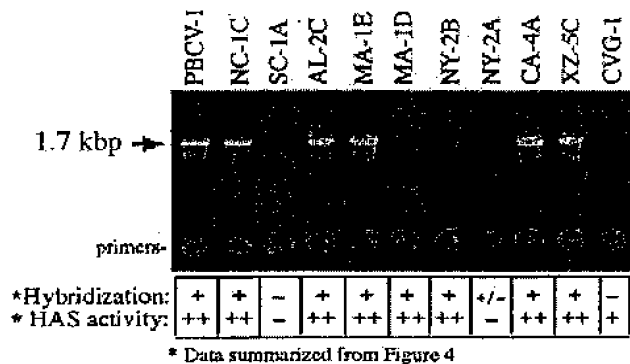


FIG. 5. PCR products produced from PBCV-1 and 10 additional chlorella viruses using primers derived from the PBCV-1 *has* gene sequence. (Bottom) Dot-blot hybridization and <sup>125</sup>I-HABP binding data from Fig. 4. No PCR products were obtained from virus DNAs that either failed to hybridize (SC-1A and CVG-1) or hybridized poorly (NY-2A, NY-2B, and MA-1D) to the PBCV-1 *has* gene probe.

sequences of the MA-1E and XZ-5C clones each contained a single, distinct, silent nucleotide difference from PBCV-1. (4) The sequence of the NC-1C clone varied by 11 nucleotides from PBCV-1; four of these changes resulted in amino acid substitutions. Three of these substitutions (R136→K, D400→E, and V534→I) were conservative changes, whereas the fourth (T360→A) was non-conservative. (5) The sequence of the CA-4A clone differed from PBCV-1 by 15 nucleotides; eight of these differences were in common with NC-1C. Seven of these differences (two were in the same codon) led to six amino acid changes; four (R136→K, I450→V, V534→I, and T562→S) were conservative, whereas two (V529→T and E554→K) were nonconservative.

Total RNA was isolated from cells infected with NC-1C or AL-2C viruses at 30 min p.i. (the time when the *a98r* gene transcript is most abundant in PBCV-1-infected cells) and analyzed by Northern blotting with the PBCV-1 *has* gene probe (Fig. 1B) as well as probes for the two PBCV-1 genes (*gfat* and *udp-glc4h*) that encode enzymes synthesizing hyaluronan precursors (Figs. 1C and 1D). This experiment led to the following results. (1) Like PBCV-1, the *has* gene probe hybridized to a 1.9-kb RNA from cells infected with each virus. (2) The *gfat* and *udp-glc4h* probes produced the same hybridization patterns for all three viruses. Landstein *et al.* (1998) demonstrated that in PBCV-1, the largest of the three RNAs detected by the *gfat* probe results from readthrough transcription of the *gfat* gene into the adjacent *a103r* gene. The *a103r* gene encodes an mRNA capping enzyme (Ho *et al.*, 1996). (3) Although the amounts of *has*, *gfat*, and *udp-glc4h* mRNAs that accumulated in AL-2C-infected cells was approximately equal to that in PBCV-1-infected cells, the amount of *has*, *gfat*, and *udp-glc4h* mRNAs that accumulated in NC-1C-infected cells was reduced considerably. Therefore, all three viral genes involved in hyaluronan synthesis are expressed in two

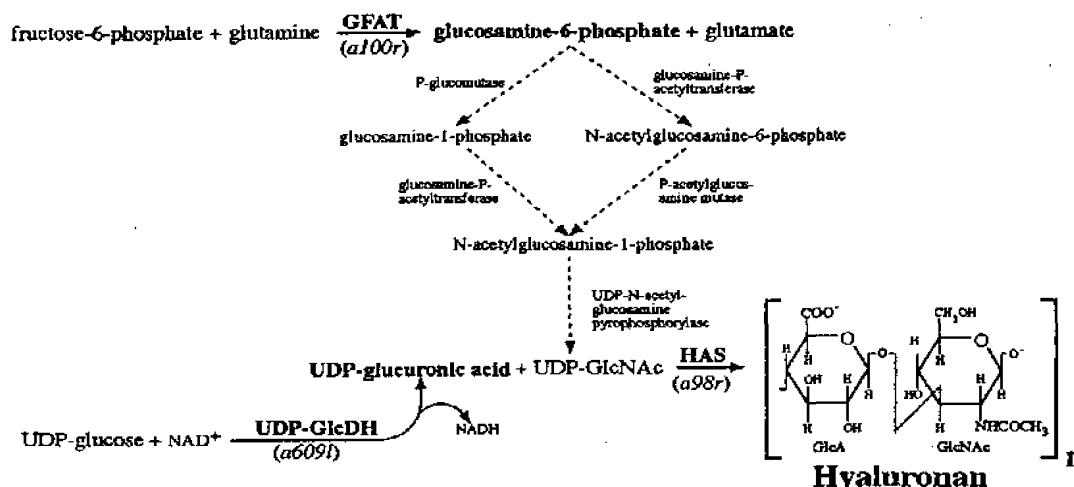


FIG. 6. Biosynthesis of hyaluronan starting with fructose-6-phosphate and UDP-glucose. Virus PBCV-1 encodes the enzyme GFAT (*a100r*), UDP-GlcDH (*a609f*), and HAS (*a98r*). The conversion of glucosamine-6-phosphate to UDP-GlcNAc requires at least three additional steps, designated by the dashed arrows. The genetic sources of these three additional enzymes are unknown.

other chlorella viruses, albeit at variable levels. This variation could reflect slight differences in the length of the NC-1C infection cycle compared with PBCV-1 and AL-2C.

## DISCUSSION

We previously reported that chlorella virus PBCV-1 encodes an authentic, membrane-associated HAS (DeAngelis *et al.*, 1997). The PBCV-1 *has* gene was expressed in *E. coli*, and as expected, the recombinant protein required the simultaneous presence of UDP-GlcA and UDP-GlcNAc and manganese for activity. Hyaluronan lyase degrades the  $3\text{--}6 \times 10^5\text{-kDa}$  hyaluronan polysaccharide product of the recombinant enzyme. Results presented here establish that the PBCV-1 *has* gene is expressed within 10 min after PBCV-1 infection and that large amounts of hyaluronan accumulate on the cell surface of infected algae. To our knowledge, PBCV-1 is the first virus to encode an enzyme that synthesizes a polysaccharide. Viruses generally use host-encoded glycosyltransferases to create new glycoconjugates or accumulate host cell glycoconjugates during virion maturation. An ecdysteroid UDP-glucosyltransferase encoded by several baculoviruses is the only previously known virus-encoded glycosyltransferase with a characterized activity (O'Reilly, 1995). The ecdysteroid UDP-glucosyltransferase inactivates the insect's molting hormones by adding a single glucose residue to the hormone.

PBCV-1 probably encodes several other glycosyltransferases in addition to HAS. Studies on four PBCV-1 antigenic variants with altered oligosaccharide moieties on the three virion-associated glycoproteins led to the prediction that PBCV-1 encodes at least part, if not its entire, glycosylation machinery (Que *et al.*, 1994; Wang *et al.*,

1993). However, several observations indicate that the HAS enzyme described in this report does not glycosylate the PBCV-1 glycoproteins. (1) The oligosaccharide or oligosaccharides attached to the PBCV-1 glycoproteins contains only neutral sugars, glucose, galactose, mannose, fucose, xylose, rhamnose, and arabinose (Wang *et al.*, 1993). (2) Hyaluronan accumulates on the outside of the virus-infected host, whereas intact infectious virus particles accumulate inside the host at least 30–40 min before release by lysis of the host cell wall. (3) Typically, hyaluronan is not covalently bound to a protein (Hascall *et al.*, 1994; Laurent and Fraser, 1992). Therefore, we conclude that HAS is not involved in PBCV-1 protein glycosylation and that the virus encodes separate glycosyltransferases for this purpose.

Landstein *et al.* (1998) previously demonstrated that PBCV-1 encodes two additional enzymes involved in hyaluronan biosynthesis: GFAT and UDP-GlcDH (Fig. 6). UDP-GlcDH converts UDP-glucose into UDP-GlcA, a precursor of hyaluronan. GFAT converts fructose-6-phosphate into glucosamine-6-phosphate, an intermediate in UDP-GlcNAc biosynthesis. Like *has*, the *udp-glcDH* and *gfat* genes are expressed early in PBCV-1 infection (Landstein *et al.*, 1998). At least three additional enzymes are needed to convert glucosamine-6-phosphate into UDP-GlcNAc (Fig. 6). Sequence comparisons have failed to identify candidate genes encoding these enzymes in the viral genome. However, the presence of three virus-encoded hyaluronan biosynthetic enzymes suggests that the polysaccharide serves an important function in the PBCV-1 life cycle.

The extracellular hyaluronan does not play an obvious role in the interaction between PBCV-1 and its algal host because neither plaque size nor plaque number is al-

tered by including either testicular hyaluronidase or free hyaluronan in the top agar of the PBCV-1 plaque assay (DeAngelis *et al.*, 1997). However, the extracellular hyaluronan weakly inhibits attachment of additional viruses, especially late in infection (Table 1). This inhibition might be advantageous to PBCV-1 because it would reduce multiple infections. The significance of this hyaluronan-mediated reduction in virus attachment is questionable, however, because NC64A viruses mutually exclude one another by a hyaluronan-independent mechanism (Chase *et al.*, 1989). This exclusion phenomenon, which has no effect on virus attachment, occurs before hyaluronan-mediated inhibition of virus attachment.

We considered two other biological functions for the PBCV-1-encoded hyaluronan; these functions are based on our limited knowledge of the natural history of the viruses. *Chlorella* viruses are ubiquitous in freshwater collected worldwide, and titers as high as  $4 \times 10^6$  infectious viruses/ml of native water have been reported (Van Etten *et al.*, 1985; Yamada *et al.*, 1991). The only known hosts for these viruses are *Chlorella*-like green algae that normally live as hereditary endosymbionts in some isolates of the ciliate *Paramecium bursaria*. In the symbiotic unit, algae are enclosed individually in perialgal vacuoles and are surrounded by a host-derived membrane (Reisser, 1992). The initial establishment and the long-term maintenance of symbiosis require that the algae avoid digestion by the paramecium. Reassociation studies with different *Chlorella* spp. and algae-free *P. bursaria* indicate that only the original symbiotic algae effectively reestablish a long-term, stable symbiosis with the ciliate (Reisser, 1992). Other *Chlorella* species are digested. Presumably, the relationship between the algae and the paramecia require interactions of specific algal surface components with host membrane factors (Meints and Pardy, 1980; Pool, 1979). Interestingly, endosymbiotic *Chlorella* are resistant to virus infection during symbiosis and become infected only when they are grown outside the paramecia (Reisser *et al.*, 1991).

One possible biological function for hyaluronan is that polysaccharide accumulation on the algal surface inhibits the uptake of virus-infected algae by paramecium. Prevention of the internalization of infected algae would enhance virus survival because virions released inside the paramecium would presumably be destroyed by the protozoan's digestive system. Alternatively, the *Chlorella* viruses might have another host in nature; perhaps the virus is transmitted because this other host is attracted to or binds to hyaluronan on virus-infected algae. In this regard, it is interesting that the intestinal pathogen *Entamoeba histolytica* has a surface protein that binds to hyaluronan (Renesto *et al.*, 1997).

However, complicating the issue of the biological significance of the extracellular hyaluronan in the PBCV-1 life cycle is the finding that some *Chlorella* viruses lack the *has* gene and do not produce extracellular hyaluro-

nan. Furthermore, cell walls of the *Chlorella* host infected with these viruses do not take on a "hairy" appearance. Consequently, the extracellular production of hyaluronan or an equivalent extracellular polysaccharide is not essential for survival of the viruses in nature because all of the tested *Chlorella* viruses have been isolated from natural sources within the past 18 years. In contrast, all the *Chlorella* NC64A viruses encode the *gfat* and *udp-glc4h* genes, as judged by dot-blot analysis (Landstein *et al.*, 1998).

## MATERIALS AND METHODS

### *Chlorella*, viruses, and plasmids

The hosts for the *Chlorella* viruses, *Chlorella* strain NC64A and *Chlorella* strain Pbi, were grown on MBBM medium (Van Etten *et al.*, 1983) and FES medium (Reisser *et al.*, 1988), respectively. Procedures for producing, purifying, and plaquing virus PBCV-1 and the other *Chlorella* viruses and isolating host and virus DNAs have been described (Van Etten *et al.*, 1981, 1983, 1983a). The plasmid pCVHAS, which contains the PBCV-1 *has* gene, has also been described (DeAngelis *et al.*, 1997).

### Detection of hyaluronan on the surface of infected cells

Virus-infected cells used to measure hyaluronan accumulation were obtained by concentrating  $1.5 \times 10^7$  cells/ml to  $2.0 \times 10^8$  cells/ml, infection with PBCV-1 (m.o.i. of 5), and collection of  $2.0 \times 10^8$  cells at various times p.i. Hyaluronan was detected on the surface of intact, infected cells using  $^{125}\text{I}$ -HABP (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Approximately 0.1  $\mu\text{Ci}$  of  $^{125}\text{I}$ -HABP was added to the infected cells, which were then incubated on ice for 60 min. The cells were collected by centrifugation, and the supernatant containing unbound, labeled protein was removed. The amount of radioactivity (i.e., the amount of HABP bound to the cells) was determined with a gamma counter. Fluorescent visualization of hyaluronan on the surface of intact cells was accomplished by adding 1.5  $\mu\text{g}$  of biotinylated aggrecan, a hyaluronan-specific binding protein (Applied Biologics Co., Winnipeg, Canada) to  $2.0 \times 10^8$  cells in 100  $\mu\text{l}$  and incubating on ice 60 min. The cells were washed three times in PBS, resuspended in 100  $\mu\text{l}$  avidin-FITC conjugate diluted 1:2000 in PBS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) followed by an additional 60-min incubation on ice. The cells were then washed three times in PBS, resuspended in 20–50  $\mu\text{l}$  of PBS, and examined under UV illumination with a Zeiss Axioskop UV microscope. In some experiments, duplicate samples were treated with 10–50 units of hyaluronan-lyase (Sigma Chemical Co.) for 60 min before the addition of the HABP. Infected cells were also quickly frozen in liquid helium and observed under the electron microscope as described previously (Heuser, 1989).

## Virus attachment to infected and uninfected chlorella cells

Fifteen milliliters of chlorella cells ( $1.5 \times 10^7$  cells/ml) were infected with PBCV-1 at a m.o.i. of 5, incubated for 15 min at 25°C, and divided into 1.5-ml samples. At various times after the initial PBCV-1 infection, virus P31 [an antigenic variant of PBCV-1 (Wang *et al.*, 1993)] was added at a m.o.i. of 5 and incubated for 15 min. Samples were treated with PBCV-1 antiserum for 15 min, followed by low-speed centrifugation to remove algae, attached virus, and unattached PBCV-1 virus complexed to antibody. The supernatant was titrated for unattached P31.

## Northern and Southern analyses

Chlorella cells ( $1 \times 10^9$ ) were collected at various times after PBCV-1 infection, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. RNA was extracted using the Trizol reagent (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), electrophoresed under denaturing conditions on 1.5% agarose/formaldehyde gels, stained with ethidium bromide, and transferred to nylon membranes. Membranes were subsequently photographed under UV illumination to visualize transferred RNA. The RNA was hybridized with either *has*, *gfat*, or *udp-glcdh* specific probes labeled with  $^{32}$ P using a random primed DNA labeling kit (GIBCO BRL) at 65°C in 50 mM NaPO<sub>4</sub>, 1% BSA, and 2% SDS. After hybridization, radioactivity bound to the membranes was detected and quantified using a Storm 840 PhosphorImager and ImageQuant software (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA). To account for loading differences between samples, the relative amount of the 3.6-kb rRNA in each lane was determined by converting the photographs of the stained membranes to digital images using a Hewlett Packard ScanJet 4C scanner and analyzing the images using the ImageQuant software.

Chlorella virus DNAs for dot blots were denatured and applied to nylon membranes (Micron Separation Inc., Westborough, MA), fixed by UV cross-linking, and hybridized with the same *has* gene probe used for the Northern analyses. Radioactivity bound to the filters was detected as described above.

## Other procedures

DNA fragments were sequenced from both strands at the University of Nebraska-Lincoln Center for Biotechnology DNA sequencing core facility. DNA and protein sequences were analyzed with the University of Wisconsin Genetics Computer Group package of programs (Genetics Computer Group, 1997). The GenBank Accession numbers for the *has* genes from viruses AL-2C, CA-4A, MA-1E, NC-1C, and XZ-5C are AF113753, AF113754, AF113755, AF113756, and AF113757, respectively.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mike Nelson and Les Lane for helpful discussions. We also thank Martin Dickman and Jeff Rollins for the use of and assistance with the Zeiss microscope. This investigation was supported in part by U.S. Public Health Service Grants GM-32441 (J.V.E.) and GM-56487 (P.L.D.), NSF-EPSCoR Cooperative Agreement EPS-9255225 (J.V.E.), and an AOC grant from the University of Nebraska Biotechnology Center (J.V.E.).

## REFERENCES

- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B., and Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61,1303-1313.
- Carter, G. R., and Annau, E. (1953). Isolation of capsular polysaccharides from colonial variants of *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 14, 475-478.
- Chase, T. E., Nelson, J. A., Burbank, D. E., and Van Etten, J. L. (1989). Mutual exclusion occurs in a chlorella-like green alga inoculated with two viruses. *J. Gen. Virol.* 70, 1829-1836.
- Culty, M., Miyake, K., Kincaide, P. W., Silorsky, E., Butcher, E. C., and Underhill, C. (1990). The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 111, 2765-2774.
- DeAngelis, P. L., Jing, W., Graves, M. V., Burbank, D. E., and Van Etten, J. L. (1997). Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1. *Science* 278, 1800-1803.
- Genetics Computer Group. (1997). Wisconsin Package Version 9.1, Madison, WI.
- Hall, C. L., Yang, B., Yang, X., Zhang, S., Turley, M., Samuel, S., Lange, L. A., Wang, C., Curpen, G. D., Savani, R. C., Greenberg, A. H., and Turley, E. A. (1995). Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell* 82, 19-28.
- Hardwick, C., Hoare, K., Owens, R., Hohn, H. P., Hook, M., Moore, D., Cripps, V., Austen, L., Nance, D. M., and Turley, E. A. (1992). Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J. Cell Biol.* 117, 1343-1350.
- Hascaill, V. C., Calabro, A., Midura, R. J., and Yanagishita, M. (1994). Isolation and characterization of proteoglycans. *Methods Enzymol.* 230, 390-417.
- Heuser, J. E. (1989). A detailed protocol for deep-etch electron microscopy of molecules. *J. Electron. Microsc. Methods* 13, 244-263.
- Ho, C. K., Van Etten, J. L., and Shuman, S. (1996). Expression and characterization of an RNA capping enzyme encoded by chlorella virus PBCV-1. *J. Virol.* 70, 6658-6664.
- Husmann, L. K., Yung, D. L., Hollingshead, S. K., and Scott, J. R. (1997). Role of putative virulence factors of *Streptococcus pyogenes* in mouse models of long-term throat colonization and pneumonia. *Infect. Immunol.* 65, 1422-1430.
- Jaworski, D. M., Kelly, G. M., and Hockfield, S. (1984). BEHAB, a new member of the proteoglycan tandem repeat family of hyaluronan-binding proteins that is restricted to the brain. *J. Cell Biol.* 125, 495-509.
- Kass, E. H., and Seastone, C. V. (1944). The role of the mucoid polysaccharide (hyaluronic acid) in the virulence of group A hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 79, 319-330.
- Kutish, G. F., Li, Y., Lu, Z., Furuta, M., Rock, D. L., and Van Etten, J. L. (1996). Analysis of 76 kb of the chlorella virus PBCV-1 330-kb genome: Map positions 182 to 258. *Virology* 223, 303-317.
- Landstein, D., Graves, M. V., Burbank, D. E., DeAngelis, P. L., and Van Etten, J. L. (1998). Chlorella virus PBCV-1 encodes functional glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase and UDP-glucose dehydrogenase enzymes. *Virology* 250, 388-396.
- Laurent, T. C., and Fraser, J. R. E. (1992). Hyaluronan. *FASEB J.* 6, 2397-2404.



- Li, Y., Lu, Z., Burbank, D. E., Kutish, G. F., Rock, D. L., and Van Etten, J. L. (1995). Analysis of 43 kb of the chlorella virus PBCV-1 330-kb genome: Map position 45 to 88. *Virology* 212, 134-150.
- Li, Y., Lu, Z., Sun, L., Ropp, S., Kutish, G. F., Rock, D. L., and Van Etten, J. L. (1997). Analysis of 74 kb of DNA located at the right end of the 330-kb chlorella virus PBCV-1 genome. *Virology* 237, 360-377.
- Lu, Z., Li, Y., Que, Q., Kutish, G. F., Rock, D. L., and Van Etten, J. L. (1998). Analysis of 94 kb of the chlorella virus PBCV-1 330-kb genome: Map positions 88 to 182. *Virology* 216, 102-123.
- Lu, Z., Li, Y., Zhang, Y., Kutish, G. F., Rock, D. L., and Van Etten, J. L. (1995). Analysis of 45 kb of DNA located at the left end of the chlorella virus PBCV-1 genome. *Virology* 206, 339-352.
- Meints, R. H., and Parfy, R. L. (1980). Quantitative demonstration of cell surface involvement in a plant-animal symbiosis: Lectin inhibition of reassociation. *J. Cell Sci.* 43, 239-251.
- Miyake, K., Underhill, C. B., Lesley, J., and Kincade, P. W. (1990). Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* 172, 69-75.
- O'Reilly, D. R. (1995). Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 541-550.
- Phillipson, L. H., and Schwartz, N. B. (1984). Subcellular localization of hyaluronate synthetase in oligodendrogloma cells. *J. Biol. Chem.* 259, 5017-5023.
- Pool, R. R. (1979). The role of algal antigenic determinants in the recognition of potential algal symbionts by cells of chlorohydra. *J. Cell Sci.* 35, 367-379.
- Que, Q., Li, Y., Wang, I. N., Lane, L. C., Chaney, W. G., and Van Etten, J. L. (1994). Protein glycosylation and myristylation in chlorella virus PBCV-1 and its antigenic variants. *Virology* 203, 320-327.
- Reisser, W. (1992). Basic mechanisms of signal exchange, recognition, specificity, and regulation in endosymbiotic systems. In "Algae and Symbioses" (W. Reisser, Ed.). Biopress Limited, Bristol, UK.
- Reisser, W., Burbank, D. E., Meints, R. H., Becker, B., and Van Etten, J. L. (1991). Viruses distinguish symbiotic *Chlorella* sp. of *Paramecium bursaria*. *Endocytobiosis Cell Res.* 7, 245-251.
- Reisser, W., Burbank, D. E., Meints, S. M., Meints, R. H., Becker, B., and Van Etten, J. L. (1988). A comparison of viruses infecting two different chlorella-like green algae. *Virology* 167, 143-149.
- Renesto, P., Sansonetti, P. J., and Guillen, N. (1997). Interaction between *Entamoeba histolytica* and intestinal epithelial cells involves a CD44 cross-reactive protein expressed on the parasite surface. *Infect. Immunol.* 65, 4330-4333.
- Salustri, A., Ulisse, S., Yanagishita, M., and Hascall, V. C. (1990). Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 265, 19517-19523.
- Schmidt, K. H., Gunther, E., and Courtney, H. S. (1996). Expression of both M protein and hyaluronic acid capsule by group A streptococcal strains results in a high virulence for chicken embryos. *Med. Microbiol. Immunol.* 184, 169-173.
- Sherman, L., Sleeman, J., Herdlich, P., and Ponta, H. (1994). Hyaluronate receptors: Key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 725-733.
- Tengblad, A. (1980). Quantitative analysis of hyaluronate in nanogram amounts. *Biochem. J.* 185, 101-105.
- Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Joshi, J., and Meints, R. H. (1984). DNA synthesis in a chlorella-like alga following infection with the virus PBCV-1. *Virology* 134, 443-449.
- Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Kuczmarski, D., and Meints, R. H. (1983a). Virus infection of culturable chlorella-like algae and development of a plaque assay. *Science* 219, 994-996.
- Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Schuster, A. M., and Meints, R. H. (1985). Lytic viruses infecting a chlorella-like alga. *Virology* 140, 135-143.
- Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Xia, Y., and Meints, R. H. (1983). Growth cycle of a virus, PBCV-1, that infects chlorella-like algae. *Virology* 126, 117-125.
- Van Etten, J. L., Lane, L. C., and Meints, R. H. (1991). Viruses and virus-like particles of eukaryotic algae. *Microbiol. Rev.* 55, 586-620.
- Van Etten, J. L., Meints, R. H., Burbank, D. E., Kuczmarski, D., Cuppels, D. A., and Lane, L. C. (1981). Isolation and characterization of a virus from the intracellular green alga symbiotic with *Hydra viridis*. *Virology* 113, 704-711.
- Wang, I. N., Li, Y., Que, Q., Bhattacharya, M., Lane, L. C., Chaney, W. G., and Van Etten, J. L. (1993). Evidence for virus-encoded glycosylation specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3840-3844.
- West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F., and Kumar, S. (1985). Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 228, 1324-1326.
- Yamada, T., Higashiyama, T., and Fukuda, T. (1991). Screening of natural waters for viruses which infect chlorella cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3433-3437.

supposition in a native ecosystem. The data presented here demonstrating that herbivory by Serengeti grazers tangibly accelerates the mineralization of two minerals of considerable importance in animal nutrition are consistent with simulation results from grassland ecosystem models (3). In addition, they indicate that the accelerated recycling of plant-available Na is probably the mechanism leading to levels of that animal nutrient in grazer-exploited Serengeti grasslands that are sufficient to alleviate nutritional shortage in the grazers, particularly reproductive females and growing young (5).

Mammalian herbivores have been pervasive in grasslands through evolutionary time (12), their levels of forage consumption are considerable (6, 13), and the animals accelerate rather than retard nutrient cycling. The intensity of the plant-herbivore interaction in grasslands, and its evolutionary antiquity, may have attenuated detrimental interaction effects through coevolution (1). Overgrazing of grasslands, on the other hand, which is commonly associated with the replacement of free-ranging wild herbivores with livestock and the resulting higher animal densities (14), often causes the replacement of highly palatable forages (15) that produce easily decomposable litter (10) with other plant species of lower nutritional quality and decomposability.

These data provide evidence that a terrestrial grazer can modify ecosystem processes in such a way as to alleviate nutritional deficiencies and, therefore, plausibly to elevate the carrying capacity of the ecosystem. The data also identify accelerated nutrient cycling as an important property of habitats that are critical to large mammal conservation (16). The coupling of animal site preference with nutritional effects could provide a guide for identifying sites essential for planning large mammal conservation in natural ecosystems. In addition, the presence of such sites, and the role of mammals in maintaining them, provide clear evidence that habitat deterioration is not an inescapable consequence of increased density of organisms (1).

#### REFERENCES AND NOTES

1. A. F. Hunter and L. W. Aarssen, *BioScience* 38, 34 (1988); T. S. Bianchi, C. G. Jones, M. Shachak, *Trends Ecol. Evol.* 4, 234 (1989); M. D. Bertness and R. Callaway, *ibid.* 9, 181 (1994); C. G. Jones, J. H. Lawton, M. Shachak, *Oikos* 69, 373 (1994).
2. R. G. Woodmansee, *BioScience* 28, 443 (1978); S. J. McNaughton, *Oikos* 40, 329 (1983); J. K. Detling, in *Concepts of Ecosystem Ecology: A Comparative View*, L. R. Pomeroy and J. J. Alberts, Eds. (Springer-Verlag, New York, 1988), pp. 131-148; D. A. Frank et al., *Biogeochemistry* 26, 163 (1994).
3. E. A. Holland and J. K. Detling, *Ecology* 71, 1040 (1990); E. A. Holland, W. J. Parton, J. K. Detling, D. L. Coppock, *Am. Nat.* 140, 685 (1992); S. W. Seagle, S. J. McNaughton, R. W. Ruess, *Ecology* 73, 1105 (1992); D. A. Frank and R. D. Evans, *ibid.* 78, 2238 (1997).
4. J. Pastor, R. J. Naiman, B. Dewey, P. F. Molness, *BioScience* 38, 770 (1988); J. Pastor, B. Dewey, R. J. Naiman, P. F. Molness, Y. Cohen, *Ecology* 74, 467 (1993).
5. S. J. McNaughton, *Nature* 334, 343 (1988); *ibid.* 345, 813 (1990).
6. ———, *Ecol. Monogr.* 53, 291 (1983); *ibid.* 55, 259 (1985).
7. Procedures followed R. S. Siegel, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44, 943 (1980); R. J. Raison, M. J. Connell, P. K. Khanna, *Soil Biol. Biochem.* 19, 521 (1987); A. Mehlich, *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 15, 1409 (1984); F. J. Adamsen, D. S. Bigelow, G. R. Scott, *ibid.* 16, 833 (1985); and (5). Soils for N analyses were extracted with 1 M KCl, soils for Na analyses were extracted with Mehlich solution No. 3, and both extracts were preserved with phenylmercuric acetate. Mineral N as  $\text{NH}_4$  and  $\text{NO}_3$  was determined by continuous flow analysis (Lachat QuikChem AE, Milwaukee, WI), and Na was determined by inductively coupled argon plasma spectrometry (Leman Labs PS3000 (Hudson, MA) in simultaneous mode). Data were analyzed by nested (plot within site) repeated measures of analysis of variance (C. N. von Ende, in *Design and Analysis of Ecological Experiments*, S. M. Scheiner and J. Gurevitch, Eds. (Chapman and Hall, New York, 1993), pp. 113-137).
8. J. K. Detling and E. L. Painter, *Oecologia* 57, 65 (1993); W. G. Gold and M. M. Caldwell, *ibid.* 81, 437 (1989).
9. K. Mengel and E. A. Kirkby, *Principles of Plant Nutrition* (International Potash Institute, Bern, Switzerland, 1982), pp. 61-62.
10. D. A. Wedin and D. Tilman, *Oecologia* 84, 433 (1990); S. Enriquez, C. M. Duarte, K. Sand-Jensen, *ibid.* 84, 457 (1993); D. A. Wedin and D. Tilman, *Science* 274, 1720 (1996); J. P. Grime, J. H. C. Cornelissen, K. Thompson, J. G. Hodgson, *Oikos* 77, 489 (1996).
11. S. J. McNaughton, F. F. Banyikwa, M. M. McNaughton, *Ecosystems*, in press.
12. S. J. McNaughton, in *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*, P. W. Price, T. M. Lewinsch, G. W. Fernandes, W. W. Benson, Eds. (Wiley-Interscience, New York, 1991), pp. 509-522.
13. S. J. McNaughton, M. Oesterheld, D. A. Frank, K. J. Williams, *Nature* 341, 142 (1989); S. J. McNaughton, in *Terrestrial Global Productivity: Past, Present, Future*, J. Roy, B. Schmid, H. A. Mooney, Eds. (Academic Press, San Diego, CA, in press).
14. M. Oesterheld, O. Sala, S. J. McNaughton, *Nature* 358, 234 (1992).
15. R. F. Noss and A. Y. Cooperider, *Saving Nature's Legacy* (Island Press, Washington, DC, 1994).
16. S. J. McNaughton and F. F. Banyikwa, in *Serengeti II: Dynamics, Management, and Conservation of an Ecosystem*, A. R. E. Sinclair and P. Arcese, Eds. (Univ. of Chicago Press, Chicago, IL, 1995), pp. 49-70.
17. Research was supported by NSF grant DEB-9312435. Permission to do research and live in Serengeti National Park was granted by the Scientific Research Council of Tanzania, Tanzania National Parks, Serengeti National Park, and the Serengeti Wildlife Research Institute. Housing and laboratory space were provided by the Serengeti Wildlife Research Centre. We are grateful to E. M. Peter for tireless field and lab assistance.

8 August 1997; accepted 28 October 1997

## Hyaluronan Synthase of Chlorella Virus PBCV-1

Paul L. DeAngelis,\* Wei Jing, Michael V. Graves, Dwight E. Burbank, James L. Van Etten

Sequence analysis of the 330-kilobase genome of the virus PBCV-1 that infects a chlorella-like green algae revealed an open reading frame, A98R, with similarity to several hyaluronan synthases. Hyaluronan is an essential polysaccharide found in higher animals as well as in a few pathogenic bacteria. Expression of the A98R gene product in *Escherichia coli* indicated that the recombinant protein is an authentic hyaluronan synthase. A98R is expressed early in PBCV-1 infection and hyaluronan is produced in infected algae. These results demonstrate that a virus can encode an enzyme capable of synthesizing a carbohydrate polymer and that hyaluronan exists outside of animals and their pathogens.

Hyaluronan or hyaluronic acid (HA), a member of the glycosaminoglycan family that also includes heparin and chondroitin, is a linear polysaccharide composed of alternating  $\beta$ 1,4-glucuronic acid ( $\beta$ 1,4-GlcA) and  $\beta$ 1,3-N-acetylglucosamine ( $\beta$ 1,3-GlcNAc) groups. Typically the full-length polymer chains are composed of  $10^3$  to  $10^4$  monosaccharides ( $10^6$  to  $10^7$  daltons). HA is an im-

portant structural element in the vitreous humor of eye, synovial fluid, and skin of vertebrates (1). Furthermore, HA interacts with proteins such as CD44, RHAMM, and fibrinogen, thereby influencing many natural processes such as angiogenesis, cancer, cell motility, wound healing, and cell adhesion (2). HA also constitutes the extracellular capsules of certain bacterial pathogens such as group A and C *Streptococcus* and *Pasteurella multocida* type A (3, 4). These capsules act as virulence factors that protect the microbes from phagocytosis and complement during infection (5, 6). Because HA, a component of the host tissues, is not normally immunogenic, the capsule serves as molecular camouflage (7).

HA synthases (HASs) are integral mem-

P. L. DeAngelis and W. Jing, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oklahoma Health Sciences Center, 940 Stanton L. Young Boulevard, Oklahoma City, OK 73104, USA.  
M. V. Graves, D. E. Burbank, J. L. Van Etten, Department of Plant Pathology, University of Nebraska, Lincoln, NE 68583-0722, USA.

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: paul-deangelis@OUHSC.edu

brane proteins that polymerize the HA molecule using activated uridine diphosphate (UDP)-sugar nucleotides as substrates. Amino acid sequences for some HASs have been deduced from gene sequencing (8); their sizes range from 419 to 588 residues. The vertebrate enzymes (DG42, HAS1, HAS2, and HAS3) and streptococcal HasA have several regions of sequence similarity. Recently, while sequencing the double-stranded DNA genome of virus PBCV-1 (*Paramecium bursaria* chlorella virus), we unexpectedly discovered an open reading frame (ORF), A98R (GenBank accession number U42580), encoding a 568-residue protein with similarity to the known HASs (28 to 33% amino acid identity in pairwise comparisons by FASTA) (Fig. 1).

PBCV-1 is the prototype of a family (Phycodnaviridae) of large (175 to 190 nm in diameter) polyhedral, plaque-forming viruses that replicate in certain unicellular,

eukaryotic chlorella-like green algae (9). PBCV-1 virions contain at least 50 different proteins and a lipid component located inside the outer glycoprotein capsid (10). The PBCV-1 genome is a linear, nonpermuted 330-kb double-stranded DNA molecule with covalently closed hairpin ends (11).

On the basis of its deduced amino acid sequence, the A98R gene product should be an integral membrane protein. To test this hypothesis, we produced recombinant A98R protein in *Escherichia coli* and assayed the membrane fraction for HAS activity (12, 13). UDP-GlcA and UDP-GlcNAc were incorporated into polysaccharide by the membrane fraction derived from cells containing the A98R ORF on a plasmid, pCVHAS, (average specific activity of 2.5 pmol of GlcA transferred per minute per microgram of protein), but not by samples from control cells (<0.001 pmol of GlcA transferred per

minute per microgram of protein). No activity was detected in the soluble fraction of cells transformed with pCVHAS. UDP-GlcA and UDP-GlcNAc were simultaneously required for polymerization. The activity was optimal in Hepes buffer at pH 7.2 in the presence of 15 mM  $MnCl_2$ , whereas no activity was detected if the metal ion was omitted. The ions  $Mg^{2+}$  and  $Co^{2+}$  were ~20% as effective as  $Mn^{2+}$  at similar concentrations. The *P. multocida* HAS (14) has a similar metal requirement, but other HASs prefer  $Mg^{2+}$ .

We also tested the specificity of recombinant A98R for UDP-sugars (15). Only the two authentic HA precursors were incorporated into polysaccharide; neither UDP-galacturonic acid (UDP-GalA) nor UDP-N-acetylgalactosamine (UDP-GalNAc), the C4 epimers of UDP-GlcA or UDP-GlcNAc, respectively, were incorporated. Likewise, UDP-glucose (UDP-Glc) was not polymerized in place of either HA precursor. This strong substrate specificity for UDP-GlcA and UDP-GlcNAc is a general feature of the HASs HasA (13) and DG42 (16).

The recombinant A98R enzyme synthesized a polysaccharide with an average molecular size of  $3 \times 10^6$  to  $6 \times 10^6$  daltons (Fig. 2), which is smaller than that of the HA synthesized by recombinant HasA or DG42 in vitro ( $\sim 10^7$  daltons and  $\sim 5 \times 10^6$  to  $8 \times 10^6$  daltons, respectively) (13, 16).

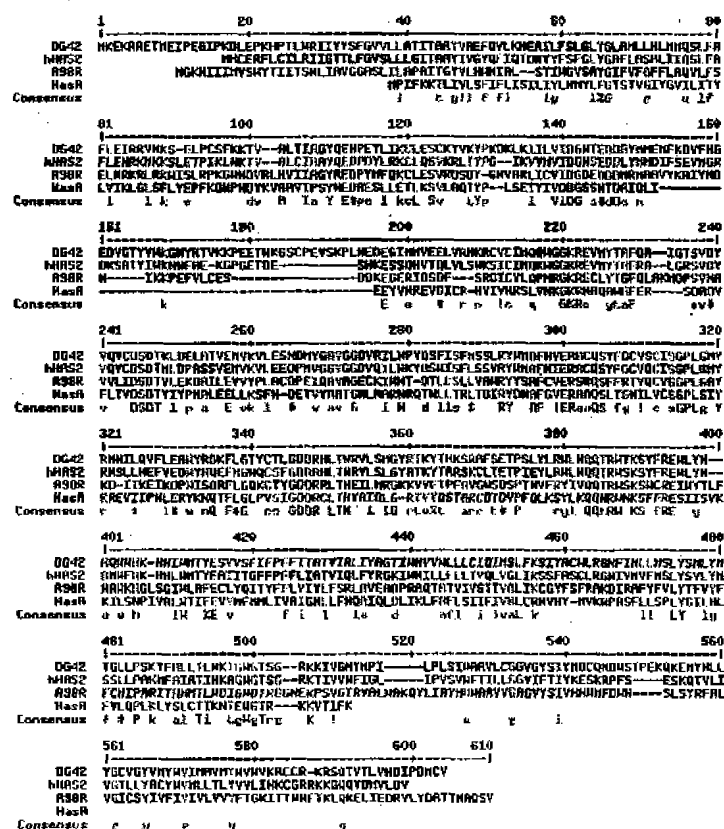


Fig. 1. Sequence similarity of HASs. The Multalin program (26) was used to align the amino acid sequences of HASs *Xenopus laevis* DG42, human HAS2, PBCV-1 A98R, and *Streptococcus pyogenes* HasA (red; 90% consensus; green, 50% consensus, as calculated by Multalin) (8). In the consensus sequence, the symbols are: I, any one of I or V; S, any one of L or M; %, any one of F or Y; #, any one of N, D, E, or Q. Single-letter abbreviations for the amino acid residues are as follows: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; and Y, Tyr.

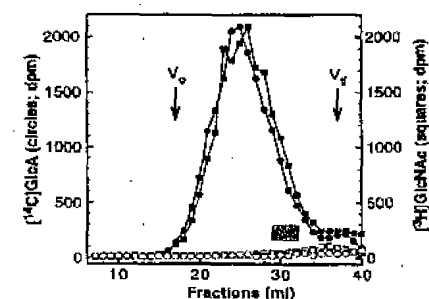


Fig. 2. Size exclusion chromatography of polymer product of recombinant A98R HAS. Membranes derived from *E. coli* cells transformed with pCVHAS were incubated with both radiolabeled HA precursors diluted to the same specific activity (27). After deproteinization and removal of unincorporated precursors, samples were injected onto a Sephacryl S-500HR size exclusion column, and the radioactivity in the fractions was measured ( $^3H$ , solid squares;  $^{14}C$ , open circles). A duplicate sample was treated with HA lyase before deproteinization and chromatography ( $^3H$ , open squares;  $^{14}C$ , open circles); no polymer remains after digestion. Size standards:  $V_0$ , arrow, void volume, HA derived from recombinant streptococcal HasA ( $17 \text{ ml}$ ;  $\geq 2 \times 10^7$  daltons) (13); crosshatched box, blue dextran ( $29$  to  $32 \text{ ml}$ ; average molecular size  $2 \times 10^6$  daltons; Pharmacia);  $V_i$ , arrow, totally included volume, UDP-sugars ( $37 \text{ ml}$ ).

The polysaccharide was completely degraded by *Streptomyces hyalurolyticus* HA lyase, an enzyme that depolymerizes HA but not structurally related glycosaminoglycans such as heparin and chondroitin (17).

We examined PBCV-1-infected *Chlorella* cells for A98R gene expression. A ~1700-nucleotide A98R transcript appeared about 15 min after infection and disappeared by 60 min after infection (18), indicating that A98R is an early gene. Consequently, we assayed membrane fractions from uninfected and PBCV-1-infected *Chlorella* cells at 50 and 90 min after infection for HAS activity. Infected cells, but not uninfected cells, had activity (Table 1). Like the bacterially derived recombinant A98R enzyme, radioactive label incorporation from UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA into polysaccharide depended on both Mn<sup>2+</sup> and UDP-GlcNAc. This labeled product was also degraded by HA lyase. Disrupted PBCV-1 virions had no HAS activity.

PBCV-1-infected *Chlorella* cells were analyzed for HA polysaccharide by means of a highly specific [<sup>125</sup>I]-labeled HA-binding protein (19, 20). Extracts from cells at 50 and 90 min after infection contained substantial amounts of HA (0.7 and 1400 ng per microgram of protein, respectively), but not extracts from uninfected algae (<0.04 ng per microgram of protein) or disrupted PBCV-1 virions (<0.04 ng per microgram of dry weight). The labeled HA-binding protein also interacted with intact infected cells at 50 and 90 min after infection, but not with healthy cells (21). Therefore, a considerable portion of the newly synthesized HA polysaccharide was immobilized at the outer cell surface of the infected algae.

**Table 1.** HAS activity of membranes derived from *Chlorella* cells infected with PBCV-1. The membrane fractions (370 µg of protein) from uninfected cells or cells at 50 and 90 min after infection (a.i.) were assayed with UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA (50 µM, 0.02 µCi) in parallel reactions containing the following components as indicated (300 µM UDP-GlcNAc or 15 mM MnCl<sub>2</sub> or both) for 1 hour at 30°C (28). HAS specific activity (presented as picomoles of [<sup>14</sup>C]GlcA transferred per hour per milligram of protein) was detected in the algal membranes after infection with PBCV-1, but not in uninfected cells.

Sample	UDP-GlcNAc	Mn <sup>2+</sup>	HAS specific activity
Uninfected	+	+	≤6
	+	-	≤6
	-	+	≤6
50 min a.i.	+	+	42
	+	-	≤6
	-	+	≤6
90 min a.i.	+	+	170
	+	-	≤6
	-	+	≤6

The extracellular HA does not play any obvious role in the interaction between the virus and its algal host because neither plaque size nor plaque number was altered by including either testicular hyaluronidase (465 units/ml) or free HA polysaccharide (100 µg/ml) in the top agar of the PBCV-1 plaque assay (9).

Among *Chlorella* viruses, HA biosynthesis during infection is not limited to the PBCV-1 prototype strain. Thirty-three independently isolated and plaque-purified viruses from the United States, South America, Asia, and Australia were tested for the presence of an A98R-like gene and for the ability to direct production of HA polysaccharide in *Chlorella* NC64A. Dot-blot hybridization analyses of the individual viral genomes with the PBCV-1 A98R probe indicated that 19 isolates (58%) had a similar gene; the algal host DNA did not cross-react with the probe (21). *Chlorella* cells infected with each of these 19 viruses produced cell surface HA as measured by interaction with the [<sup>125</sup>I]-HA-binding protein (21).

Surprisingly, the PBCV-1 genome also has additional genes, named A609L and A100R, that encode for a UDP-Glc dehydrogenase (UDP-Glc DH) and a glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT), respectively. UDP-Glc DH converts UDP-Glc into UDP-GlcA, a required precursor for HA biosynthesis. GFAT converts fructose-6-phosphate into glucosamine-6-phosphate, an intermediate in the UDP-GlcNAc metabolic pathway. Both of these PBCV-1 genes, like the A98R HAS, are expressed early in infection and encode enzymatically active proteins (22); however, these three genes do not function as an operon. Although two of these genes, A98R and A100R, are near one another in the viral genome (bases 50,901 to 52,607 and 52,706 to 54,493, respectively), A609L is located ~240 kb away and is transcribed in the opposite orientation (bases 292,916 to 291,747). The presence of multiple enzymes in the HA biosynthesis pathway indicates that HA production must serve an important function in the life cycle of these *Chlorella* viruses.

The details of the natural history of the phycodnaviruses are unknown. These viruses are ubiquitous in freshwater collected worldwide, and titers as high as 4 × 10<sup>4</sup> infectious viruses per milliliter of native water have been reported (23). The only known hosts for these viruses are *Chlorella*-like green algae, which normally live as hereditary endosymbionts in some isolates of the ciliate, *P. bursaria*. In the symbiotic unit, algae are enclosed individually in perialgal vacuoles and are surrounded by a host-derived membrane

(24). The endosymbiotic *Chlorella* are resistant to virus infection and are only infected when they are outside the paramecium (9). We hypothesize that HA synthesis and its accumulation on the algal surface may block the uptake of virus-infected algae by the paramecium. Alternatively, the *Chlorella* viruses might have another host in nature (such as an aquatic animal); perhaps the virus is transmitted because this other host is attracted to or binds to the HA polysaccharide on virus-infected algae.

As depicted in Fig. 1, HASs of *Streptococcus*, vertebrates, and PBCV-1 have many motifs of two to four residues that occur in the same relative order. These conserved motifs probably reflect domains crucial for HA biosynthesis. Regions of similarity between HASs and other enzymes that synthesize β-linked polysaccharides from UDP-sugar precursors are also being discovered as more glycosyltransferases are sequenced (25). The significance of these similar structural motifs will become more apparent as the three-dimensional structures of glycosyltransferases are determined.

The fact that *Chlorella* virus PBCV-1 encodes a functional glycosyltransferase that can synthesize HA is contrary to the general observation that viruses either (i) use host cell glycosyltransferases to create new carbohydrate structures, or (ii) accumulate host cell glycoconjugates during virion maturation. Furthermore, HA has been generally regarded as restricted to animals and a few of their virulent bacterial pathogens. Though many plant carbohydrates have been characterized, to our knowledge, neither HA nor a related analog has previously been detected in cells of plants or protists.

## REFERENCES AND NOTES

1. T. C. Laurent and J. R. E. Fraser, *FASEB J.* 6, 2397 (1992).
2. C. B. Knudson and W. Knudson, *ibid.* 7, 1234 (1993).
3. E. H. Kass and C. V. Seastone, *J. Exp. Med.* 79, 319 (1944).
4. G. R. Carter and E. Annu, *Am. J. Vet. Res.* 14, 475 (1953).
5. B. G. Harmon, J. R. Glisson, K. S. Latimer, W. L. Steffens, J. C. Nurnally, *ibid.* 52, 1507 (1991).
6. M. R. Wessels, A. E. Moses, J. B. Goldberg, T. J. DiCesare, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 8317 (1991).
7. A. W. Quinn and K. P. Sing, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95, 290 (1957).
8. P. L. DeAngelis, J. Papaconstantinou, P. H. Weigel, *J. Biol. Chem.* 268, 19181 (1993); P. H. Weigel, V. C. Hascall, M. Tammi, *ibid.* 272, 13997 (1997).
9. J. L. Van Etten, L. C. Lane, R. H. Meints, *Microbiol. Rev.* 55, 585 (1991); J. L. Van Etten, *Mol. Cells* 5, 99 (1995); D. E. Burbank, D. Kuczmarski, R. H. Meints, *Science* 219, 994 (1983).
10. M. P. Skrdla, D. E. Burbank, Y. Xia, R. H. Meints, J. L. Van Etten, *Virology* 135, 308 (1984); I.-N. Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3640 (1993).
11. J. Rochozinski, L. E. Gilton, J. L. Van Etten, *Virology*

- 168, 353 (1989); Y. Zhang, P. Strasser, R. Grabherr, J. L. Van Etten, *ibid.* 202, 1079 (1994).
12. The A98R ORF was cloned after amplification of genomic viral DNA with 22 cycles of polymerase chain reaction (PCR) with Taq polymerase [F. M. Ausubel *et al.*, in *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York, ed. 3, 1995)]. The oligonucleotide primers [sense 5'-gagagctcATGGTAAAAA-CATTATCATAATGG-3'; antisense 5'-gcattcgcacT-CACACAGACTGAGCATTGGTAG-3'; Great American Gene Company] contained Nco I or Sal I restriction sites (underlined, respectively) flanking the ORF encoding 568 amino acids (uppercase letters). Codons 4 and 5 were altered to optimize bacterial expression. The PCR product was purified, digested with Nco I and Sal I, and ligated into a modified version of the plasmid pET-8C [B. A. Moffatt and F. W. Studier, *J. Mol. Biol.* 189, 113 (1986)] (it has an extra Sal I site in the polylinker) cleaved with Nco I and partially digested with Sal I. This construct placed the A98R ORF under the control of a T7 phage promoter. The resulting plasmid, pCVHAS, was transformed into the expression host, *E. coli* BL21(DE3). The A98R protein was expressed by induction with 1 mM isopropylthiogalactoside. After 3 to 5 hours of further growth, the membrane fraction was isolated (13). Control membrane preparations were made from cultures with the same vector containing an irrelevant gene (a protein kinase). Total protein was measured according to M. M. Bradford [*Anal. Biochem.* 72, 248 (1976)]. The paper chromatography method was used to assay for HAS activity (13).
13. P. L. DeAngelis and P. H. Weigel, *Biochemistry* 33, 9033 (1994).
14. P. L. DeAngelis, *ibid.* 35, 9768 (1996).
15. Assays with *E. coli*-derived A98R were incubated either with 120  $\mu$ M UDP-[ $^{14}$ C]GlcA or with 150  $\mu$ M UDP-[ $^3$ H]GlcNAc. The reactions also contained one unlabeled sugar nucleotide (an authentic precursor or UDP-Glc, UDP-GalA, or UDP-GalNAc) at 300  $\mu$ M. Less than 5% of the maximal incorporation (assay with UDP-GlcA and UDP-GlcNAc present) was detected if an unnatural UDP-sugar was substituted for UDP-GlcA or UDP-GlcNAc, or if only a single precursor was present.
16. P. E. Pummil, A. M. Achyuthan, P. L. DeAngelis, in preparation.
17. T. Ohya and Y. Kaneko, *Biochim. Biophys. Acta* 198, 607 (1970).
18. M. V. Graves, D. Landstein, J. L. Van Etten, unpublished results.
19. A. Tengblad, *Biochem. J.* 185, 101 (1980).
20. A competitive radiometric assay based on a [ $^{125}$ I]-labeled HA-binding protein (19) (Pharmacia HA Test) was used to measure the amount of HA in disrupted (freeze-thawed) virus particles or the cultures of NC64A cells. The cells were disrupted by vigorous agitation with glass beads (1-mm beads, agitated for 3 min four times; Biospec Mini-Beadbeater-8). The cell lysate was clarified by centrifugation (15,000g, 5 min) before assaying (average of two determinations).
21. P. L. DeAngelis, M. V. Graves, J. L. Van Etten, unpublished results.
22. D. Landstein, P. L. DeAngelis, J. L. Van Etten, in preparation.
23. J. L. Van Etten, D. E. Burbank, A. M. Schuster, R. H. Meints, *Virology* 140, 135 (1985); T. Yamada, T. Higashiyama, T. Fukuda, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3433 (1991).
24. W. Reisser, Ed., *Algae and Symbioses* (Biospress, Bristol, UK, 1992).
25. P. L. DeAngelis, N. Yang, P. H. Weigel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1 (1994); I. M. Saxena *et al.*, *J. Bacteriology* 177, 1419 (1995).
26. F. Corpet, *Nucleic Acids Res.* 16, 10881 (1988).
27. Membranes (860  $\mu$ g of protein) were incubated with 120  $\mu$ M UDP-[ $^{14}$ C]GlcA (0.36  $\mu$ Ci) and 840  $\mu$ M UDP-[ $^3$ H]GlcNAc (2.6  $\mu$ Ci) in 300  $\mu$ l of 50 mM Hepes, pH 7.2, with 15 mM MnCl<sub>2</sub> for 3 hours at 30°C. EDTA (18 mM final concentration) was then added to stop the HAS activity. Half of the reaction was deproteinized by treatment with 0.5% SDS (w/v) and Pronase (final concentration of 200  $\mu$ g/ml, 5 hours at 37°C; Boehringer Mannheim). Unincorporated precursors and other small molecules were removed by ultrafiltration (Microcon10, 10<sup>4</sup>-daltons cutoff, Amicon). Half of this semipurified sample was injected onto a Sephacryl S-500HR column (1 cm by 50 cm; Pharmacia) equilibrated in 0.2 M NaCl, 5 mM Tris, pH 8 (0.5 ml/min, 1-ml fractions). To verify that the identity of the labeled polysaccharide was HA, we treated the other half of the original reaction with HA lyase (30 units at 37°C overnight; Sigma) before the deproteinization step. This treatment degraded the radioactive polymer to small oligosaccharides (tetramers and hexamers) that were removed by ultrafiltration before gel filtration chromatography.
28. Two cultures of NC64A cells (0.9 liter,  $1.9 \times 10^{10}$  cells) were infected with PBCV-1 (multiplicity of infection of 5) and incubated for 50 or 90 min after infection. Another culture served as an uninfected control.
- The cells were harvested, and the membrane fraction (yield ~3 mg of protein) was prepared as described [P. L. DeAngelis and A. M. Achyuthan, *J. Biol. Chem.* 271, 23657 (1996)], except that 1 mM mercaptoethanol was substituted for dithiothreitol. The paper chromatography method was used to assay for HAS activity (13).
29. We thank A. M. Achyuthan, G. M. Air, M. K. Brakke, R. D. Cummings, L. C. Lane, M. Nelson, and P. H. Weigel for helpful discussions. R. A. Steinberg provided the plasmids and host strain for T7 expression system. Supported by a NIH grant (R01-GM56497) and a University of Oklahoma Medical Alumni Scholarship to P.L.D. and a NIH grant (R01-GM32441) to J.V.E.

15 September 1997; accepted 30 October 1997

## Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by PIAS3

Chan D. Chung,\* JIayu Liao,\* Bin Liu, Xiaoping Rao, Philippe Jay, Philippe Berta, Ke Shuai†

The signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) protein is activated by the interleukin 6 (IL-6) family of cytokines, epidermal growth factor, and leptin. A protein named PIAS3 (protein inhibitor of activated STAT) that binds to Stat3 was isolated and characterized. The association of PIAS3 with Stat3 in vivo was only observed in cells stimulated with ligands that cause the activation of Stat3. PIAS3 blocked the DNA-binding activity of Stat3 and inhibited Stat3-mediated gene activation. Although Stat1 is also phosphorylated in response to IL-6, PIAS3 did not interact with Stat1 or affect its DNA-binding or transcriptional activity. The results indicate that PIAS3 is a specific inhibitor of Stat3.

Stat3 participates in signal transduction pathways activated by the IL-6 family of cytokines and by epidermal growth factor (1, 2). Stat3 is also activated in cells treated with leptin, a growth hormone that functions in regulating food intake and energy expenditure (3). Targeted disruption of the mouse gene encoding Stat3 leads to early embryonic lethality (4). Like other members of the STAT family, Stat3 becomes tyrosine phosphorylated by Janus kinases (JAKs). Phosphorylated Stat3 then forms a dimer and translocates into the nucleus to activate specific genes (5). We cloned a protein named PIAS1, which can specifically interact with Stat1

(another member of the STAT family), by the yeast two-hybrid assays (6). We searched the expressed sequence tag (EST) database for other PIAS family members and identified a human EST clone encoding a polypeptide related to the COOH-terminal portion of PIAS1 (7). We obtained a full-length cDNA containing an open reading frame of 583 amino acids by screening a mouse thymus library with the human EST clone (8). The corresponding protein, named PIAS3, contains a putative zinc-binding motif [C<sub>2</sub>-(X)<sub>21</sub>-C<sub>2</sub>] (9), a feature conserved in the PIAS family (Fig. 1A). Northern (RNA) blot analysis indicated that PIAS3 is widely expressed in various human tissues (Fig. 1B).

To study the function of PIAS3, we prepared a specific antiserum (anti-PIAS3c) to a recombinant fusion protein of glutathione-S-transferase (GST) with the 79 COOH-terminal amino acid residues of PIAS3. This antibody detected a protein with a molecular mass of about 68 kD, the predicted size of PIAS3, in both cytoplasmic and nuclear extracts of a number of human and murine cell lines (10). To identify which STAT protein interacts with PIAS3, we prepared protein

C. D. Chung and J. Liao, Department of Biological Chemistry, University of California, Los Angeles, CA 90095, USA.

B. Liu and X. Rao, Division of Hematology-Oncology, Department of Medicine, University of California, Los Angeles, CA 90095, USA.

P. Jay and P. Berta, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, 1919 route de Menda, 34000 Montpellier, France.

K. Shuai, Division of Hematology-Oncology, Department of Medicine, Department of Biological Chemistry, and Molecular Biology Institute, University of California, 11-934 Factor Building, 10833 LeConte Avenue, Los Angeles, CA 90095-1678, USA.

\*These authors contributed equally to this manuscript.  
†To whom correspondence should be addressed.

CORRECTED  
VERSION\*

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau
















INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : <b>C12N 9/10, 15/54, 15/70, C12Q 1/68, A61K 31/715, C12P 21/00, 19/04</b>		A3	(11) International Publication Number: <b>WO 99/23227</b>
			(43) International Publication Date: 14 May 1999 (14.05.99)
(21) International Application Number: PCT/US98/23153		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) International Filing Date: 30 October 1998 (30.10.98)		<b>Published</b> <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	
(30) Priority Data: 60/064,435 31 October 1997 (31.10.97) US 09/178,851 26 October 1998 (26.10.98) US		(88) Date of publication of the international search report: 19 August 1999 (19.08.99)	
(71) Applicant: THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA [US/US]; 1000 Asp Avenue, Norman, OK 73019 (US).		<b>EPO - DG 1</b>	
(72) Inventors: WEIGEL, Paul, H.; 817 Hollowdale, Edmond, OK 73003 (US). KUMARI, Kshama; Apartment 467, 2609 Featherstone Road, Oklahoma City, OK 73120 (US). DeANGELIS, Paul; 706 Sunnybrook Drive, Edmond, OK 73034 (US).		<b>- 7. 02. 2000</b>	
(74) Agents: PALMER, John et al.; Ladas & Parry, Suite 2100, 5670 Wilshire Boulevard, Los Angeles, CA 90036-5679 (US).		<b>(82)</b>	
(54) Title: <b>HYALURONAN SYNTHASE GENE AND USES THEREOF</b>			
(57) Abstract <p>The present invention relates to a nucleic acid segment having a coding region segment encoding enzymatically active <i>Streptococcus equisimilis</i> hyaluronate synthase (seHAS), and to the use of this nucleic acid segment in the preparation of recombinant cells which produce hyaluronate synthase and its hyaluronic acid product. Hyaluronate is also known as hyaluronic acid or hyaluronan.</p>			

**FOR THE PURPOSES OF FORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front page of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain		LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland		LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France		LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon		LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	M	Monaco	TD	Chad	
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	M	Republic of Moldova	TG	Togo	
BB	Barbados	GH	Ghana	M	Madagascar	TJ	Tajikistan	
BE	Belgium	GN	Guinea	M	The former Yugoslav	TM	Turkmenistan	
BF	Burkina Faso	GR	Greece		Republic of Macedonia	TR	Turkey	
BG	Bulgaria	HU	Hungary	M	Mali	TT	Trinidad and Tobago	
BJ	Benin	IE	Ireland	M	Mongolia	UA	Ukraine	
BR	Brazil	IL	Israel	M	Mauritania	UG	Uganda	
BY	Belarus	IS	Iceland	M	Malawi	US	United States of America	
CA	Canada	IT	Italy	M	Mexico	UZ	Uzbekistan	
CF	Central African Republic	JP	Japan		N	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya		NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan		N	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's		NZ	New Zealand		
CM	Cameroon		Republic of Korea		PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea		P	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan		R	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia		R	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein		S	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka		SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia		S	Singapore		

## HYALURONAN SYNTHASE GENE AND USES THEREOF

10

## BACKGROUND OF THE INVENTION

## 15 1. Field of the Invention.

The present invention relates to a nucleic acid segment having a coding region segment encoding enzymatically active *Streptococcus equisimilis* hyaluronate synthase (seHAS), and to the use of this nucleic acid segment in the preparation of recombinant cells which  
20 produce hyaluronate synthase and its hyaluronic acid product. Hyaluronate is also known as hyaluronic acid or hyaluronan.

## 2. Brief Description of the Related Art.

The incidence of streptococcal infections is a major health and economic problem worldwide, particularly in developing  
25 countries. One reason for this is due to the ability of Streptococcal bacteria to grow undetected by the body's phagocytic cells, i.e., macrophages and polymorphonuclear cells (PMNs). These cells are responsible for recognizing and engulfing foreign



microorganisms. One effective way the bacteria evade surveillance is by coating themselves with polysaccharide capsules, such as a hyaluronic acid (HA) capsule. The structure of HA is identical in both prokaryotes and eukaryotes. Since HA is generally nonimmunogenic, the encapsulated bacteria do not elicit an immune response and are, therefore, not targeted for destruction. Moreover, the capsule exerts an antiphagocytic effect on PMNs in vitro and prevents attachment of *Streptococcus* to macrophages. Precisely because of this, in Group A and Group C *Streptococci*, the HA capsules are major virulence factors in natural and experimental infections. Group A *Streptococcus* are responsible for numerous human diseases including pharyngitis, impetigo, deep tissue infections, rheumatic fever and a toxic shock-like syndrome. The Group C *Streptococcus equisimilis* is responsible for osteomyelitis, pharyngitis, brain abscesses, and pneumonia.

Structurally, HA is a high molecular weight linear polysaccharide of repeating disaccharide units consisting of N-acetylglucosamine (GlcNAc) and glucuronic acid (GlcA). The number of repeating disaccharides in an HA molecule can exceed 30,000, a  $M_r > 10^7$ . HA is the only glycosaminoglycan synthesized by both mammalian and bacterial cells particularly Groups A and C *Streptococci* and Type A *Pasturella multocida*. These strains make HA which is secreted into the medium as well as HA capsules. The mechanism by which these bacteria synthesize HA is of broad interest medically since the production of the HA capsule is a

==

very efficient and clever way that *Streptococci* use to evade surveillance by the immune system.

HA is synthesized by mammalian and bacterial cells by the enzyme hyaluronate synthase which has been localized to the plasma membrane. It is believed that the synthesis of HA in these organisms is a multi-step process. Initiation involves binding of an initial precursor, UDP-GlcNAc or UDP-GlcA. This is followed by elongation which involves alternate addition of the two sugars to the growing oligosaccharide chain. The growing polymer is extruded across the plasma membrane region of the cell and into the extracellular space. Although the HA biosynthetic system was one of the first membrane heteropolysaccharide synthetic pathways studied, the mechanism of HA synthesis is still not well understood. This may be because in vitro systems developed to date are inadequate in that *de novo* biosynthesis of HA has not been accomplished.

The direction of HA polymer growth is still a matter of disagreement among those of ordinary skill in the art. Addition of the monosaccharides could be to the reducing or nonreducing end of the growing HA chain. Furthermore, questions remain concerning (i) whether nascent chains are linked covalently to a protein, to UDP or to a lipid intermediate, (ii) whether chains are initiated using a primer, and (iii) the mechanism by which the mature polymer is extruded through the plasma membrane of the *Streptococcus*. Understanding the mechanism of HA biosynthesis may allow

development of alternative strategies to control *Streptococcal* and *Pasturella* infections by interfering in the process.

HA has been identified in virtually every tissue in vertebrates and has achieved widespread use in various clinical applications, most notably and appropriately as an intra-articular matrix supplement and in eye surgery. The scientific literature has also shown a transition from the original perception that HA is primarily a passive structural component in the matrix of a few connective tissues and in the capsule of certain strains of bacteria to a recognition that this ubiquitous macromolecule is dynamically involved in many biological processes: from modulating cell migration and differentiation during embryogenesis to regulation of extracellular matrix organization and metabolism to important roles in the complex processes of metastasis, wound healing, and inflammation. Further it is becoming clear that HA is highly metabolically active and that cells focus much attention on the processes of its synthesis and catabolism. For example, the half-life of HA in tissues ranges from 1 to 3 weeks in cartilage to <1 day in epidermis.

It is now clear that a single protein utilizes both sugar substrates to synthesize HA. The abbreviation HAS, for the HA synthase, has gained widespread support for designating this class of enzymes. Markovitz et al. successfully characterized the HAS activity from *Streptococcus pyogenes* and discovered the enzyme's membrane localization and its requirements for sugar nucleotide precursors and  $Mg^{2+}$ . Prehm found that elongating HA, made by B6

cells, was digested by hyaluronidase added to the medium and proposed that HAS resides at the plasma membrane. Philipson and Schwartz also showed that HAS activity cofractionated with plasma membrane markers in mouse oligodendrogloma cells.

5 HAS assembles high  $M_r$  HA that is simultaneously extruded through the membrane into the extracellular space (or to make the cell capsule in the case of bacteria) as glycosaminoglycan synthesis proceeds. This mode of biosynthesis is unique among macromolecules since nucleic acids, proteins, and lipids are  
10 synthesized in the nucleus, endoplasmic reticulum/Golgi, cytoplasm, or mitochondria. The extrusion of the growing chain into the extracellular space also allows for unconstrained polymer growth, thereby achieving the exceptionally large size of HA, whereas confinement of synthesis within a Golgi or post-Golgi compartment  
15 could limit the overall amount or length of the polymers formed. High concentrations of HA within a confined lumen could also create a high viscosity environment that might be deleterious for other organelle functions.

Several studies attempted to solubilize, identify, and purify  
20 HAS from strains of *Streptococci* that make a capsular coat of HA as well as from eukaryotic cells. Although the streptococcal and murine oligodendrogloma enzymes were successfully detergent-solubilized and studied, efforts to purify an active HAS for further study or molecular cloning remained unsuccessful for  
25 decades. Prehm and Mausolf used periodate-oxidized UDP-GlcA or UDP-GlcNAc to affinity label a protein of ~52 kDa in streptococcal

membranes that co-purified with HAS. This led to a report claiming that the Group C streptococcal HAS had been cloned, which was unfortunately erroneous. This study failed to demonstrate expression of an active synthase and may have actually cloned a peptide transporter. Triscott and van de Rijn used digitonin to solubilize HAS from streptococcal membranes in an active form. Van de Rijn and Drake selectively radiolabeled three streptococcal membrane proteins of 42, 33, and 22-kDa with 5-azido-UDP-GlcA and suggested that the 33-kDa protein was HAS. As shown later, however, HAS actually turned out to be the 42-kDa protein.

Despite these efforts, progress in understanding the regulation and mechanisms of HA synthesis was essentially stalled, since there were no molecular probes for HAS mRNA or HAS protein. A major breakthrough occurred in 1993 when DeAngelis et al. reported the molecular cloning and characterization of the Group A streptococcal gene encoding the protein HasA. This gene was known to be in part of an operon required for bacterial HA synthesis, although the function of this protein, which is now designated as spHAS (the *S. pyogenes* HAS), was unknown. spHAS was subsequently proven to be responsible for HA elongation and was the first glycosaminoglycan synthase identified and cloned and then successfully expressed. The *S. pyogenes* HA synthesis operon encodes two other proteins. HasB is a UDP-glucose dehydrogenase, which is required to convert UDP-glucose to UDP-GlcA, one of the substrates for HA synthesis. HasC is a UDP-glucose pyrophosphorylase, which is required to convert glucose 1-phosphate

and UTP to UDP-glucose. Co-transfection of both *hasA* and *hasB* genes into either acapsular *Streptococcus* strains or *Enterococcus faecalis* conferred them with the ability to synthesize HA and form a capsule. This provided the first strong evidence that HasA is an HA synthase.

The elusive HA synthase gene was finally cloned by a transposon mutagenesis approach, in which an acapsular mutant Group A strain was created containing a transposon interruption of the HA synthesis operon. Known sequences of the transposon allowed the region of the junction with streptococcal DNA to be identified and then cloned from wild-type cells. The encoded sPHAS was 5-10% identical to a family of yeast chitin synthases and 30% identical to the *Xenopus laevis* protein DG42 (developmentally expressed during gastrulation), whose function was unknown at the time. DeAngelis and Weigel expressed the active recombinant sPHAS in *Escherichia coli* and showed that this single purified gene product synthesizes high  $M_r$  HA when incubated in vitro with UDP-GlcA and UDP-GlcNAc, thereby showing that both glycosyltransferase activities required for HA synthesis are catalyzed by the same protein, as first proposed in 1959. This set the stage for the almost simultaneous identification of eukaryotic HAS cDNAs in 1996 by four laboratories revealing that HAS is a multigene family encoding distinct isozymes. Two genes (*HAS1* and *HAS2*) were quickly discovered in mammals (29-34), and a third gene *HAS3* was later discovered. A second streptococcal sPHAS or *Streptococcus*

*equisimilis* hyaluronate synthase, as now been found and is the invention being claimed and disclosed herein.

As indicated, we have also identified the authentic HAS gene from Group C *Streptococcus equisimilis* (seHAS); the seHAS protein  
5 has a high level of identity (approximately 70 percent) to the spHAS enzyme. This identity, however, is interesting because the seHAS gene does not cross-hybridize to the spHAS gene.

Membranes prepared from *E. coli* expressing recombinant seHAS synthesize HA when both substrates are provided. The results  
10 confirm that the earlier report of Lansing et al. claiming to have cloned the Group C HAS was wrong. Unfortunately, several studies have employed antibody to this uncharacterized 52-kDa streptococcal protein to investigate what was believed to be eukaryotic HAS.

Itano and Kimata used expression cloning in a mutant mouse  
15 mammary carcinoma cell line, unable to synthesize HA, to clone the first putative mammalian HAS cDNA (mmHAS1). Subclones defective in HA synthesis fell into three separate classes that were complementary for HA synthesis in somatic cell fusion experiments, suggesting that at least three proteins are required. Two of these  
20 classes maintained some HA synthetic activity, whereas one showed none. The latter cell line was used in transient transfection experiments with cDNA prepared from the parental cells to identify a single protein that restored HA synthetic activity. Sequence analyses revealed a deduced primary structure for a protein of ~65  
25 kDa with a predicted membrane topology similar to that of spHAS. mmHAS1 is 30% identical to spHAS and 55% identical to DG42. The

==

same month this report appeared, three other groups submitted papers describing cDNAs encoding what was initially thought to be the same mouse and human enzyme. However, through an extraordinary circumstance, each of the four laboratories had discovered a  
5 separate HAS isozyme in both species.

Using a similar functional cloning approach to that of Itano and Kimata, Shyjan et al. identified the human homolog of HAS 1. A mesenteric lymph node cDNA library was used to transfect murine mucosal T lymphocytes that were then screened for their ability to  
10 adhere in a rosette assay. Adhesion of one transfectant was inhibited by antisera to CD44, a known cell surface HA-binding protein, and was abrogated directly by pretreatment with hyaluronidase. Thus, rosetting by this transfectant required synthesis of HA. Cloning and sequencing of the responsible cDNA  
15 identified hsHAS1. Itano and Kimata also reported a human HAS1 cDNA isolated from a fetal brain library. The hsHAS1 cDNAs reported by the two groups, however, differ in length; they encode a 578 or a 543 amino acid protein. HAS activity has only been demonstrated for the longer form.

20 Based on the molecular identification of spHAS as an authentic HA synthase and regions of near identity among DG42, spHAS, and NodC (a  $\beta$ -GlcNAc transferase nodulation factor in *Rhizobium*), Spicer et al. used a degenerate RT-PCR approach to clone a mouse embryo cDNA encoding a second distinct enzyme, which is designated  
25 mmHAS2. Transfection of mmHAS2 cDNA into COS cells directed *de novo* production of an HA cell coat detected by a particle exclusion



assay, thereby providing strong evidence that the HAS2 protein can synthesize HA. Using a similar approach, Watanabe and Yamaguchi screened a human fetal brain cDNA library to identify hsHAS2. Fulop et al. independently used a similar strategy to identify mmHAS2 in RNA isolated from ovarian cumulus cells actively synthesizing HA, a critical process for normal cumulus oophorus expansion in the pre-ovulatory follicle. Cumulus cell-oocyte complexes were isolated from mice immediately after initiating an ovulatory cycle, before HA synthesis begins, and at later times when HA synthesis is just beginning (3 h) or already apparent (4 h). RT-PCR showed that HAS2 mRNA was absent initially but expressed at high levels 3-4 h later suggesting that transcription of HAS2 regulates HA synthesis in this process. Both hsHAS2 are 552 amino acids in length and are 98% identical. mmHAS1 is 583 amino acids long and 95% identical to hsHAS1, which is 578 amino acids long.

Most recently Spicer et al. used a PCR approach to identify a third HAS gene in mammals. The mHAS3 protein is 554 amino acids long and 71, 56, and 28% identical, respectively, to mmHAS1, mmHAS2, DG42, and sPHAS. Spicer et al. have also localized the three human and mouse genes to three different chromosomes (HAS1 to hsChr 19/mmChr 17; HAS2 to hsChr 8/mmChr 15; HAS3 to hsChr 16/mmChr 8). Localization of the three HAS genes on different chromosomes and the appearance of HA throughout the vertebrate class suggest that this gene family is ancient and that isozymes appeared by duplication early in the evolution of vertebrates. The high

identity (~30%) between the bacterial and eukaryotic HASs also suggests that the two had a common ancestral gene. Perhaps primitive bacteria usurped the HAS gene from an early vertebrate ancestor before the eukaryotic gene products became larger and more complex. Alternatively, the bacteria could have obtained a larger vertebrate HAS gene and deleted regulatory sequences nonessential for enzyme activity.

The discovery of *X. laevis* DG42 by Dawid and co-workers played a significant role in these recent developments, even though this protein was not known to be an HA synthase. Nonetheless, that DG42 and spHAS were 30% identical was critical for designing oligonucleotides that allowed identification of mammalian HAS2. Ironically, definitive evidence that DG42 is a *bona fide* HA synthase was reported only after the discoveries of the Mammalian isozymes, when DeAngelis and Achyuthan expressed the recombinant protein in yeast (an organism that cannot synthesize HA) and showed that it synthesizes HA when isolated membranes are provided with the two substrates. Meyer and Kreil also showed that lysates from cells transfected with cDNA for DG42 synthesize elevated levels of HA. Now that its function is known, DG42 can, therefore, be designated XlHAS.

There are common predicted structural features shared by all the HAS proteins, including a large central domain and clusters of 2-3 transmembrane or membrane-associated domains at both the amino and carboxyl ends of the protein. The central domain, which comprises up to ~88% of the predicted intracellular HAS protein

sequences, probably contains the catalytic regions of the enzyme. This predicted central domain is 26 amino acids long in spHAS (63% of the total protein) and 307-328 residues long in the eukaryotic HAS members (54-56% of the total protein). The exact number and orientation of membrane domains and the topological organization of extracellular and intracellular loops have not yet been experimentally determined for any HAS.

spHAS is a HAS family member that has been purified and partially characterized. Initial studies using spHAS/alkaline phosphatase fusion proteins indicate that the N terminus, C terminus, and the large central domain of spHAS are, in fact, inside the cell. spHAS has 6 cysteines, whereas HAS1, HAS2, and HAS3 have 13, 14 and 14 Cys residues, respectively. Two of the 6 Cys residues in spHAS are conserved and identical in HAS1 and HAS2. Only one conserved Cys residue is found at the same position (Cys-225 in spHAS) in all the HAS family members. This may be an essential Cys whose modification by sulfhydryl poisons partially inhibits enzyme activity. The possible presence of disulfide bonds or the identification of critical Cys residues needed for any of the multiple HAS functions noted above has not yet been elucidated for any members of the HAS family.

In addition to the proposed unique mode of synthesis at the plasma membrane, the HAS enzyme family is highly unusual in the large number of functions required for the overall polymerization of HA. At least six discrete activities are present within the HAS enzyme: binding sites for each of the two different sugar

nucleotide precursors (UDP-GlcNAc and UDP-GlcA), two different glycosyltransferase activities, one or more binding sites that anchor the growing HA polymer to the enzyme (perhaps related to a B-X,-B motif), and a ratchet-like transfer reaction that moves the  
5 growing polymer one sugar at a time. This later activity is likely coincident with the stepwise advance of the polymer through the membrane. All of these functions, and perhaps others as yet unknown, are present in a relatively small protein ranging in size from 419 (spHAS) to 588 (xHAS) amino acids.

10 Although all the available evidence supports the conclusion that only the spHAS protein is required for HA biosynthesis in bacteria or in vitro, it is possible that the larger eukaryotic HAS family members are part of multicomponent complexes. Since the eukaryotic HAS proteins are ~40% larger than spHAS, their  
15 additional protein domains could be involved in more elaborate functions such as intracellular trafficking and localization, regulation of enzyme activity, and mediating interactions with other cellular components.

The unexpected finding that there are multiple vertebrate HAS  
20 genes encoding different synthases strongly supports the emerging consensus that HA is an important regulator of cell behavior and not simply a structural component in tissues. Thus, in less than six months, the field moved from one known, cloned HAS (spHAS) to recognition of a multigene family that promises rapid, numerous,  
25 and exciting future advances in our understanding of the synthesis and biology of HA.

For example, disclosed herei after are the sequences of the two HAS genes: from *Pasturella multocida*; and (2) *Paramecium bursaria chlorella virus* (PBCV-1). The presence of hyaluronan synthase in these two systems and the purification and use of the hyaluronan synthase from these two different systems indicates an ability to purify and isolate nucleic acid sequences encoding enzymatically active hyaluronan synthase in many different prokaryotic and viral sources.

Group C *Streptococcus equisimilis* strain D181 synthesizes and secretes hyaluronic acid (HA). Investigators have used this strain and Group A *Streptococcus pyogenes* strains, such as S43 and A111, to study the biosynthesis of HA and to characterize the HA-synthesizing activity in terms of its divalent cation requirement, precursor (UDP-GlcNAc and UDP-Glc) utilization, and optimum pH.

Traditionally, HA has been prepared commercially by isolation from either rooster combs or extracellular media from Streptococcal cultures. One method which has been developed for preparing HA is through the use of cultures of HA-producing Streptococcal bacteria. U.S. Patent No. 4,517,295 describes such a procedure wherein HA-producing Streptococci are fermented under anaerobic conditions in a CO<sub>2</sub>-enriched growth medium. Under these conditions, HA is produced and can be extracted from the broth. It is generally felt that isolation of HA from rooster combs is laborious and difficult, since one starts with HA in a less pure state. The advantage of isolation from rooster combs is that the HA produced is of higher molecular weight. However, preparation of HA by bacterial

fermentation is easier, since the HA is of higher purity to start with. Usually, however, the molecular weight of HA produced in this way is smaller than that from rooster combs. Therefore, a technique that would allow the production of high molecular weight HA by bacterial fermentation would be an improvement over existing procedures.

High molecular weight HA has a wide variety of useful applications -- ranging from cosmetics to eye surgery. Due to its potential for high viscosity and its high biocompatibility, HA finds particular application in eye surgery as a replacement for vitreous fluid. HA has also been used to treat racehorses for traumatic arthritis by intra-articular injections of HA, in shaving cream as a lubricant, and in a variety of cosmetic products due to its physiochemical properties of high viscosity and its ability to retain moisture for long periods of time. In fact, in August of 1997 the U.S. Food and Drug Agency approved the use of high molecular weight HA in the treatment of severe arthritis through the injection of such high molecular weight HA directly into the affected joints. In general, the higher molecular weight HA that is employed the better. This is because HA solution viscosity increases with the average molecular weight of the individual HA polymer molecules in the solution. Unfortunately, very high molecular weight HA, such as that ranging up to  $10^7$ , has been difficult to obtain by currently available isolation procedures.

To address these or other difficulties, there is a need for new methods and constructs that can be used to produce HA having

one or more improved properties such as greater purity or ease of preparation. In particular, there is a need to develop methodology for the production of larger amounts of relatively high molecular weight and relatively pure HA than is currently commercially available. There is yet another need to be able to develop methodology for the production of HA having a modified size distribution (HA<sub>size</sub>) as well as HA having a modified structure (HA<sub>mod</sub>).

The present invention addresses one or more shortcomings in the art. Using recombinant DNA technology, a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS is disclosed and claimed in conjunction, with methods to produce an enzymatically active HA synthase, as well as methods for using the nucleic acid segment in the preparation of recombinant cells which produce HAS and its hyaluronic acid product.

Thus, it is an object of the present invention to provide a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS.

It is a further object of the present invention to provide a recombinant vector which includes a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS.

It is still a further object of the present invention to provide a recombinant host cell transformed with a recombinant vector which includes a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS.

It is yet another object of the present invention to provide a method for detecting a bacterial cell that expresses HAS.

It is another object of the present invention to provide a method for producing high and/or low molecular weight hyaluronic acid from a hyaluronate synthase gene, such as seHAS, as well as methods for producing HA having a modified size distribution and/or a modified structure.

These and other objects of the present invention will become apparent in light of the attached specification, claims, and drawings.

#### BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention involves the application of recombinant DNA technology to solving one or more problems in the art of hyaluronic acid (HA) preparation. These problems are addressed through the isolation and use of a nucleic acid segment having a coding region encoding the enzymatically active *Streptococcus equisimilis* (seHAS) hyaluronate synthase gene, a gene responsible for HA chain biosynthesis. The seHAS gene was cloned from DNA of an appropriate microbial source and engineered into useful recombinant constructs for the preparation of HA and for the preparation of large quantities of the HAS enzyme itself.

The present invention encompasses a novel gene, seHAS. The expression of this gene correlates with virulence of *Streptococcal* Group A and Group C strains, by providing a means of escaping phagocytosis and immune surveillance. The terms "hyaluronic acid synthase", "hyaluronate synthase", "hyaluronan synthase" and "HA



synthase", are used interchangeably to describe an enzyme that polymerizes a glycosaminoglycan polysaccharide chain composed of alternating glucuronic acid and N-acetylglucosamine sugars,  $\beta$  1,3 and  $\beta$  1,4 linked. The term "seHAS" describes the HAS enzyme  
5 derived from *Streptococcus equisimilis*.

The present invention concerns the isolation and characterization of a hyaluronate hyaluronic acid synthase gene, cDNA, and gene product (HAS), as may be used for the polymerization of glucuronic acid and N-acetylglucosamine into the  
10 glycosaminoglycan hyaluronic acid. The present invention identifies the seHAS locus and discloses the nucleic acid sequence which encodes for the enzymatically active seHAS gene from *Streptococcus equisimilis*. The HAS gene also provides a new probe to assess the potential of bacterial specimens to produce  
15 hyaluronic acid.

Through the application of techniques and knowledge set forth herein, those of skill in the art will be able to obtain nucleic acid segments encoding the seHAS gene. As those of skill in the art will recognize, in light of the present disclosure, these  
20 advantages provide significant utility in being able to control the expression of the seHAS gene and control the nature of the seHAS gene product, the seHAS enzyme, if it is produced.

Accordingly, the invention is directed to the isolation of a purified nucleic acid segment which has a coding region encoding  
25 enzymatically active HAS, whether it be from prokaryotic or eukaryotic sources. This is possible because the enzyme, and

CORRECTED  
VERSION\*

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : <b>C12N 9/10, 15/54, 15/70, C12Q 1/68, A61K 31/715, C12P 21/00, 19/04</b>		A3	(11) International Publication Number: <b>WO 99/23227</b>
			(43) International Publication Date: 14 May 1999 (14.05.99)
(21) International Application Number: <b>PCT/US98/23153</b>		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MK, NE, SN, TD, TG).	
(22) International Filing Date: 30 October 1998 (30.10.98)		<b>Published</b> <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	
(30) Priority Data: 60/064,435 31 October 1997 (31.10.97) US 09/178,851 26 October 1998 (26.10.98) US		(88) Date of publication of the international search report: 19 August 1999 (19.08.99)	
(71) Applicant: THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA [US/US]; 1000 Asp Avenue, Norman, OK 73019 (US).		<b>EPO - DG 1</b>	
(72) Inventors: WEIGEL, Paul, H.; 817 Hollowdale, Edmond, OK 73003 (US). KUMARI, Kshama; Apartment 467, 2609 Featherstone Road, Oklahoma City, OK 73120 (US). DeANGELIS, Paul; 706 Sunnybrook Drive, Edmond, OK 73034 (US).		<b>- 7. 02. 2000</b>	
(74) Agents: PALMER, John et al.; Ladas & Parry, Suite 2100, 5670 Wilshire Boulevard, Los Angeles, CA 90036-5679 (US).		<b>(82)</b>	
(54) Title: <b>HYALURONAN SYNTHASE GENE AND USES THEREOF</b>			
(57) Abstract <p>The present invention relates to a nucleic acid segment having a coding region segment encoding enzymatically active <i>Streptococcus equisimilis</i> hyaluronate synthase (seHAS), and to the use of this nucleic acid segment in the preparation of recombinant cells which produce hyaluronate synthase and its hyaluronic acid product. Hyaluronate is also known as hyaluronic acid or hyaluronan.</p>			

\*[Referred to in PCT Gazette No. 4/2000, Section II]

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front page of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	M	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	M	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	M	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	M	The former Yugoslav	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece		Republic of Macedonia	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	M	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	M	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	M	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	M	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	M	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	N	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	N	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	N	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's		New Zealand		
CM	Cameroon		Republic of Korea	P	Poland		
CN	China	KH	Republic of Korea	P	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	R	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	R	Russian Federation		
DE	Germany	LJ	Liechtenstein	S	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	S	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	S	Singapore		

## HYALURONAN SYNTHASE GENE AND USES THEREOF

10

## BACKGROUND OF THE INVENTION

## 15 1. Field of the Invention.

The present invention relates to a nucleic acid segment having a coding region segment encoding enzymatically active *Streptococcus equisimilis* hyaluronate synthase (seHAS), and to the use of this nucleic acid segment in the preparation of recombinant cells which  
20 produce hyaluronate synthase and its hyaluronic acid product. Hyaluronate is also known as hyaluronic acid or hyaluronan.

## 2. Brief Description of the Related Art.

The incidence of streptococcal infections is a major health and economic problem worldwide, particularly in developing  
25 countries. One reason for this is due to the ability of *Streptococcal* bacteria to grow undetected by the body's phagocytic cells, i.e., macrophages and polymorphonuclear cells (PMNs). These cells are responsible for recognizing and engulfing foreign

microorganisms. One effective way bacteria evade surveillance is by coating themselves with polysaccharide capsules, such as a hyaluronic acid (HA) capsule. The structure of HA is identical in both prokaryotes and eukaryotes. Since HA is generally nonimmunogenic, the encapsulated bacteria do not elicit an immune response and are, therefore, not targeted for destruction. Moreover, the capsule exerts an antiphagocytic effect on PMNs in vitro and prevents attachment of *Streptococcus* to macrophages. Precisely because of this, in Group A and Group C *Streptococci*, the HA capsules are major virulence factors in natural and experimental infections. Group A *Streptococci* are responsible for numerous human diseases including pharyngitis, impetigo, deep tissue infections, rheumatic fever and a toxic shock-like syndrome. The Group C *Streptococcus equisimilis* is responsible for osteomyelitis, pharyngitis, brain abscesses, and pneumonia.

Structurally, HA is a high molecular weight linear polysaccharide of repeating disaccharide units consisting of N-acetylglucosamine (GlcNAc) and glucuronic acid (GlcA). The number of repeating disaccharides in an HA molecule can exceed 30,000, a  $M_r > 10^7$ . HA is the only glycosaminoglycan synthesized by both mammalian and bacterial cells particularly Groups A and C *Streptococci* and Type A *Pasturella multocida*. These strains make HA which is secreted into the medium as well as HA capsules. The mechanism by which these bacteria synthesize HA is of broad interest medically since the production of the HA capsule is a

==

very efficient and clever way that *Streptococci* use to evade surveillance by the immune system.

HA is synthesized by mammalian and bacterial cells by the enzyme hyaluronate synthase which has been localized to the plasma membrane. It is believed that the synthesis of HA in these organisms is a multi-step process. Initiation involves binding of an initial precursor, UDP-GlcNAc or UDP-GlcA. This is followed by elongation which involves alternate addition of the two sugars to the growing oligosaccharide chain. The growing polymer is extruded across the plasma membrane region of the cell and into the extracellular space. Although the HA biosynthetic system was one of the first membrane heteropolysaccharide synthetic pathways studied, the mechanism of HA synthesis is still not well understood. This may be because in vitro systems developed to date are inadequate in that *de novo* biosynthesis of HA has not been accomplished.

The direction of HA polymer growth is still a matter of disagreement among those of ordinary skill in the art. Addition of the monosaccharides could be to the reducing or nonreducing end of the growing HA chain. Furthermore, questions remain concerning (i) whether nascent chains are linked covalently to a protein, to UDP or to a lipid intermediate, (ii) whether chains are initiated using a primer, and (iii) the mechanism by which the mature polymer is extruded through the plasma membrane of the *Streptococcus*. Understanding the mechanism of HA biosynthesis may allow

development of alternative strategies to control *Streptococcal* and *Pasturella* infections by interfering in the process.

HA has been identified in virtually every tissue in vertebrates and has achieved widespread use in various clinical applications, most notably and appropriately as an intra-articular matrix supplement and in eye surgery. The scientific literature has also shown a transition from the original perception that HA is primarily a passive structural component in the matrix of a few connective tissues and in the capsule of certain strains of bacteria to a recognition that this ubiquitous macromolecule is dynamically involved in many biological processes: from modulating cell migration and differentiation during embryogenesis to regulation of extracellular matrix organization and metabolism to important roles in the complex processes of metastasis, wound healing, and inflammation. Further it is becoming clear that HA is highly metabolically active and that cells focus much attention on the processes of its synthesis and catabolism. For example, the half-life of HA in tissues ranges from 1 to 3 weeks in cartilage to <1 day in epidermis.

It is now clear that a single protein utilizes both sugar substrates to synthesize HA. The abbreviation HAS, for the HA synthase, has gained widespread support for designating this class of enzymes. Markovitz et al. successfully characterized the HAS activity from *Streptococcus pyogenes* and discovered the enzyme's membrane localization and its requirements for sugar nucleotide precursors and  $Mg^{2+}$ . Prehm found that elongating HA, made by B6

cells, was digested by hyaluronidase added to the medium and proposed that HAS resides at the plasma membrane. Philipson and Schwartz also showed that HAS activity cofractionated with plasma membrane markers in mouse oligodendrogloma cells.

5 HAS assembles high  $M_r$  HA that is simultaneously extruded through the membrane into the extracellular space (or to make the cell capsule in the case of bacteria) as glycosaminoglycan synthesis proceeds. This mode of biosynthesis is unique among macromolecules since nucleic acids, proteins, and lipids are  
10 synthesized in the nucleus, endoplasmic reticulum/Golgi, cytoplasm, or mitochondria. The extrusion of the growing chain into the extracellular space also allows for unconstrained polymer growth, thereby achieving the exceptionally large size of HA, whereas confinement of synthesis within a Golgi or post-Golgi compartment  
15 could limit the overall amount or length of the polymers formed. High concentrations of HA within a confined lumen could also create a high viscosity environment that might be deleterious for other organelle functions.

Several studies attempted to solubilize, identify, and purify  
20 HAS from strains of *Streptococci* that make a capsular coat of HA as well as from eukaryotic cells. Although the streptococcal and murine oligodendrogloma enzymes were successfully detergent-solubilized and studied, efforts to purify an active HAS for further study or molecular cloning remained unsuccessful for  
25 decades. Prehm and Mausolf used periodate-oxidized UDP-GlcA or UDP-GlcNAc to affinity label a protein of ~52 kDa in streptococcal



membranes that co-purified with HAS. This led to a report claiming that the Group C streptococcal H<sup>+</sup> had been cloned, which was unfortunately erroneous. This study failed to demonstrate expression of an active synthase and may have actually cloned a peptide transporter. Triscott and van de Rijn used digitonin to solubilize HAS from streptococcal membranes in an active form. Van de Rijn and Drake selectively radiolabeled three streptococcal membrane proteins of 42, 33, and 27-kDa with 5-azido-UDP-GlcA and suggested that the 33-kDa protein was HAS. As shown later, however, HAS actually turned out to be the 42-kDa protein.

Despite these efforts, progress in understanding the regulation and mechanisms of HA synthesis was essentially stalled, since there were no molecular probes for HAS mRNA or HAS protein. A major breakthrough occurred in 1993 when DeAngelis et al. reported the molecular cloning and characterization of the Group A streptococcal gene encoding the protein HasA. This gene was known to be in part of an operon required for bacterial HA synthesis, although the function of this protein, which is now designated as spHAS (the *S. pyogenes* HAS), was unknown. spHAS was subsequently proven to be responsible for HA elongation and was the first glycosaminoglycan synthase identified and cloned and then successfully expressed. The *S. pyogenes* HA synthesis operon encodes two other proteins. HasB is a UDP-glucose dehydrogenase, which is required to convert UDP-glucose to UDP-GlcA, one of the substrates for HA synthesis. HasC is a UDP-glucose pyrophosphorylase, which is required to convert glucose 1-phosphate

and UTP to UDP-glucose. Co-transfection of both *hasA* and *hasB* genes into either acapsular *Streptococcus* strains or *Enteroccus faecalis* conferred them with the ability to synthesize HA and form a capsule. This provided the first strong evidence that *HasA* is an  
5 HA synthase.

The elusive HA synthase gene was finally cloned by a transposon mutagenesis approach, in which an acapsular mutant Group A strain was created containing a transposon interruption of the HA synthesis operon. Known sequences of the transposon allowed the  
10 region of the junction with streptococcal DNA to be identified and then cloned from wild-type cells. The encoded spHAS was 5-10% identical to a family of yeast chitin synthases and 30% identical to the *Xenopus laevis* protein DG42 (developmentally expressed during gastrulation), whose function was unknown at the time.

DeAngelis and Weigel expressed the active recombinant spHAS in  
15 *Escherichia coli* and showed that this single purified gene product synthesizes high  $M_r$  HA when incubated in vitro with UDP-GlcA and UDP-GlcNAc, thereby showing that both glycosyltransferase activities required for HA synthesis are catalyzed by the same  
20 protein, as first proposed in 1959. This set the stage for the almost simultaneous identification of eukaryotic HAS cDNAs in 1996 by four laboratories revealing that HAS is a multigene family encoding distinct isozymes. Two genes (*HAS1* and *HAS2*) were quickly discovered in mammals (29-34), and a third gene *HAS3* was later  
25 discovered. A second streptococcal seHAS or *Streptococcus*

*equisimilis* hyaluronate synthase, as now been found and is the invention being claimed and disclosed herein.

As indicated, we have also identified the authentic HAS gene from Group C *Streptococcus equisimilis* (seHAS); the seHAS protein  
5 has a high level of identity (approximately 70 percent) to the spHAS enzyme. This identity, however, is interesting because the seHAS gene does not cross-hybridize to the spHAS gene.

Membranes prepared from *E. coli* expressing recombinant seHAS synthesize HA when both substrates are provided. The results  
10 confirm that the earlier report of Lansing et al. claiming to have cloned the Group C HAS was wrong. Unfortunately, several studies have employed antibody to this uncharacterized 52-kDa streptococcal protein to investigate what was believed to be eukaryotic HAS.

Itano and Kimata used expression cloning in a mutant mouse  
15 mammary carcinoma cell line, unable to synthesize HA, to clone the first putative mammalian HAS cDNA (mHAS1). Subclones defective in HA synthesis fell into three separate classes that were complementary for HA synthesis in somatic cell fusion experiments, suggesting that at least three proteins are required. Two of these  
20 classes maintained some HA synthetic activity, whereas one showed none. The latter cell line was used in transient transfection experiments with cDNA prepared from the parental cells to identify a single protein that restored synthetic activity. Sequence analyses revealed a deduced primary structure for a protein of ~65  
25 kDa with a predicted membrane topology similar to that of spHAS. mmHAS1 is 30% identical to spHAS and 55% identical to DG42. The

==

same month this report appeared, three other groups submitted papers describing cDNAs encoding what was initially thought to be the same mouse and human enzyme. However, through an extraordinary circumstance, each of the four laboratories had discovered a  
5 separate HAS isozyme in both species.

Using a similar functional cloning approach to that of Itano and Kimata, Shyjan et al. identified the human homolog of HAS 1. A mesenteric lymph node cDNA library was used to transfect murine mucosal T lymphocytes that were then screened for their ability to  
10 adhere in a rosette assay. Adhesion of one transfectant was inhibited by antisera to CD44, a known cell surface HA-binding protein, and was abrogated directly by pretreatment with hyaluronidase. Thus, rosetting by this transfectant required synthesis of HA. Cloning and sequencing of the responsible cDNA  
15 identified hsHAS1. Itano and Kimata also reported a human HAS1 cDNA isolated from a fetal brain library. The hsHAS1 cDNAs reported by the two groups, however, differ in length; they encode a 578 or a 543 amino acid protein. HAS activity has only been demonstrated for the longer form.

20 Based on the molecular identification of spHAS as an authentic HA synthase and regions of near identity among DG42, spHAS, and NodC (a  $\beta$ -GlcNAc transferase modulation factor in *Rhizobium*), Spicer et al. used a degenerate RT-PCR approach to clone a mouse embryo cDNA encoding a second distinct enzyme, which is designated  
25 mmHAS2. Transfection of mmHAS2 cDNA into COS cells directed de novo production of an HA cell coat detected by a particle exclusion

assay, thereby providing strong evidence that the HAS2 protein can synthesize HA. Using a similar approach, Watanabe and Yamaguchi screened a human fetal brain cDNA library to identify hsHAS2. Fulop et al. independently used a similar strategy to identify mmHAS2 in RNA isolated from ovarian cumulus cells actively synthesizing HA, a critical process for normal cumulus oophorus expansion in the pre-ovulatory follicle. Cumulus cell-oocyte complexes were isolated from mice immediately after initiating an ovulatory cycle, before HA synthesis begins, and at later times when HA synthesis is just beginning (3 h) or already apparent (4 h). RT-PCR showed that HAS2 mRNA was absent initially but expressed at high levels 3-4 h later, suggesting that transcription of HAS2 regulates HA synthesis in this process. Both hsHAS2 are 552 amino acids in length and are 98% identical. mmHAS1 is 583 amino acids long and 95% identical to hsHAS1, which is 578 amino acids long.

Most recently Spicer et al. used a PCR approach to identify a third HAS gene in mammals. The mHAS3 protein is 554 amino acids long and 71, 56, and 28% identical, respectively, to mmHAS1, mmHAS2, DG42, and spHAS. Spicer et al. have also localized the three human and mouse genes to three different chromosomes (HAS1 to hsChr 19/mmChr 17; HAS2 to hsChr 8/mmChr 15; HAS3 to hsChr 16/mmChr 8). Localization of the three HAS genes on different chromosomes and the appearance of HA throughout the vertebrate class suggest that this gene family is ancient and that isozymes appeared by duplication early in the evolution of vertebrates. The high

identity (~30%) between the bacterial and eukaryotic HASs also suggests that the two had a common ancestral gene. Perhaps primitive bacteria usurped the HAS gene from an early vertebrate ancestor before the eukaryotic gene products became larger and more complex. Alternatively, the bacteria could have obtained a larger vertebrate HAS gene and deleted regulatory sequences nonessential for enzyme activity.

The discovery of *X. laevis* DG42 by Dawid and co-workers played a significant role in these recent developments, even though this protein was not known to be an HA synthase. Nonetheless, that DG42 and spHAS were 30% identical was critical for designing oligonucleotides that allowed identification of mammalian HAS2. Ironically, definitive evidence that DG42 is a *bona fide* HA synthase was reported only after the discoveries of the Mammalian isozymes, when DeAngelis and Achyuthan expressed the recombinant protein in yeast (an organism that cannot synthesize HA) and showed that it synthesizes HA when isolated membranes are provided with the two substrates. Meyer and Kreil also showed that lysates from cells transfected with cDNA for DG42 synthesize elevated levels of HA. Now that its function is known, DG42 can, therefore, be designated XlHAS.

There are common predicted structural features shared by all the HAS proteins, including a large central domain and clusters of 2-3 transmembrane or membrane-associated domains at both the amino and carboxyl ends of the protein. The central domain, which comprises up to ~88% of the predicted intracellular HAS protein

sequences, probably contains the catalytic regions of the enzyme. This predicted central domain is 26 amino acids long in spHAS (63% of the total protein) and 307-328 residues long in the eukaryotic HAS members (54-56% of the total protein). The exact number and orientation of membrane domains and the topological organization of extracellular and intracellular loops have not yet been experimentally determined for any HAS.

spHAS is a HAS family member that has been purified and partially characterized. Initial studies using spHAS/alkaline phosphatase fusion proteins indicate that the N terminus, C terminus, and the large central domain of spHAS are, in fact, inside the cell. spHAS has 6 cysteines, whereas HAS1, HAS2, and HAS3 have 13, 14 and 14 Cys residues, respectively. Two of the 6 Cys residues in spHAS are conserved and identical in HAS1 and HAS2. Only one conserved Cys residue is found at the same position (Cys-225 in spHAS) in all the HAS family members. This may be an essential Cys whose modification by sulfhydryl poisons partially inhibits enzyme activity. The possible presence of disulfide bonds or the identification of critical Cys residues needed for any of the multiple HAS functions noted above has not yet been elucidated for any members of the HAS family.

In addition to the proposed unique mode of synthesis at the plasma membrane, the HAS enzyme family is highly unusual in the large number of functions required for the overall polymerization of HA. At least six discrete activities are present within the HAS enzyme: binding sites for each of the two different sugar

nucleotide precursors (UDP-GlcNAc and UDP-GlcA), two different glycosyltransferase activities, one or more binding sites that anchor the growing HA polymer to the enzyme (perhaps related to a B-X<sub>2</sub>-B motif), and a ratchet-like transfer reaction that moves the growing polymer one sugar at a time. This later activity is likely coincident with the stepwise advance of the polymer through the membrane. All of these functions, and perhaps others as yet unknown, are present in a relatively small protein ranging in size from 419 (spHAS) to 588 (xHAS) amino acids.

Although all the available evidence supports the conclusion that only the spHAS protein is required for HA biosynthesis in bacteria or in vitro, it is possible that the larger eukaryotic HAS family members are part of multicomponent complexes. Since the eukaryotic HAS proteins are ~40% larger than spHAS, their additional protein domains could be involved in more elaborate functions such as intracellular trafficking and localization, regulation of enzyme activity, and mediating interactions with other cellular components.

The unexpected finding that there are multiple vertebrate HAS genes encoding different synthases strongly supports the emerging consensus that HA is an important regulator of cell behavior and not simply a structural component in tissues. Thus, in less than six months, the field moved from one known, cloned HAS (spHAS) to recognition of a multigene family that promises rapid, numerous, and exciting future advances in our understanding of the synthesis and biology of HA.



For example, disclosed herei after are the sequences of the two HAS genes: from *Pasturella multocida*; and (2) *Paramecium bursaria chlorella virus* (PBCV-1). The presence of hyaluronan synthase in these two systems and the purification and use of the hyaluronan synthase from these two different systems indicates an ability to purify and isolate nucleic acid sequences encoding enzymatically active hyaluronan synthase in many different prokaryotic and viral sources.

Group C *Streptococcus equisimilis* strain D181 synthesizes and secretes hyaluronic acid (HA). Investigators have used this strain and Group A *Streptococcus pyogenes* strains, such as S43 and A111, to study the biosynthesis of HA and to characterize the HA-synthesizing activity in terms of its divalent cation requirement, precursor (UDP-GlcNAc and UDP-Glc) utilization, and optimum pH.

Traditionally, HA has been prepared commercially by isolation from either rooster combs or extracellular media from Streptococcal cultures. One method which has been developed for preparing HA is through the use of cultures of HA-producing Streptococcal bacteria. U.S. Patent No. 4,517,295 describes such a procedure wherein HA-producing Streptococci are fermented under anaerobic conditions in a CO<sub>2</sub>-enriched growth medium. Under these conditions, HA is produced and can be extracted from the broth. It is generally felt that isolation of HA from rooster combs is laborious and difficult, since one starts with HA in a less pure state. The advantage of isolation from rooster combs is that the HA produced is of higher molecular weight. However, separation of HA by bacterial

fermentation is easier, since the HA is of higher purity to start with. Usually, however, the molecular weight of HA produced in this way is smaller than that from rooster combs. Therefore, a technique that would allow the production of high molecular weight HA by bacterial fermentation would be an improvement over existing procedures.

High molecular weight HA has a wide variety of useful applications -- ranging from cosmetics to eye surgery. Due to its potential for high viscosity and its high biocompatibility, HA finds particular application in eye surgery as a replacement for vitreous fluid. HA has also been used to treat racehorses for traumatic arthritis by intra-articular injections of HA, in shaving cream as a lubricant, and in a variety of cosmetic products due to its physiochemical properties of high viscosity and its ability to retain moisture for long periods of time. In fact, in August of 1997 the U.S. Food and Drug Agency approved the use of high molecular weight HA in the treatment of severe arthritis through the injection of such high molecular weight HA directly into the affected joints. In general, the higher molecular weight HA that is employed the better. This is because HA solution viscosity increases with the average molecular weight of the individual HA polymer molecules in the solution. Unfortunately, very high molecular weight HA, such as that ranging up to  $10^7$ , has been difficult to obtain by currently available isolation procedures.

To address these or other difficulties, there is a need for new methods and constructs that can be used to produce HA having

one or more improved properties such as greater purity or ease of preparation. In particular, there is a need to develop methodology for the production of larger amounts of relatively high molecular weight and relatively pure HA than is currently commercially available. There is yet another need to be able to develop methodology for the production of HA having a modified size distribution ( $HA_{\Delta size}$ ) as well as HA having a modified structure ( $HA_{\Delta mod}$ ).

The present invention addresses one or more shortcomings in the art. Using recombinant DNA technology, a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active seHAS is disclosed and claimed in conjunction, with methods to produce an enzymatically active HA synthase, as well as methods for using the nucleic acid segment in the preparation of recombinant cells which produce HAS and its hyaluronic acid product.

Thus, it is an object of the present invention to provide a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS.

It is a further object of the present invention to provide a recombinant vector which includes a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS.

It is still a further object of the present invention to provide a recombinant host cell transformed with a recombinant vector which includes a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS.

It is yet another object of the present invention to provide a method for detecting a bacterial cell that expresses HAS.

It is another object of the present invention to provide a method for producing high and/or low molecular weight hyaluronic acid from a hyaluronate synthase gene, such as seHAS, as well as methods for producing HA having a modified size distribution and/or a modified structure.

These and other objects of the present invention will become apparent in light of the attached specification, claims, and drawings.

#### BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention involves the application of recombinant DNA technology to solving one or more problems in the art of hyaluronic acid (HA) preparation. These problems are addressed through the isolation and use of a nucleic acid segment having a coding region encoding the enzymatically active *Streptococcus equisimilis* (seHAS) hyaluronate synthase gene, a gene responsible for HA chain biosynthesis. The seHAS gene was cloned from DNA of an appropriate microbial source and engineered into useful recombinant constructs for the preparation of HA and for the preparation of large quantities of the HAS enzyme itself.

The present invention encompasses a novel gene, seHAS. The expression of this gene correlates with virulence of Streptococcal Group A and Group C strains, by providing a means of escaping phagocytosis and immune surveillance. The terms "hyaluronic acid synthase", "hyaluronate synthase", "hyaluronan synthase" and "HA

synthase", are used interchangeably to describe an enzyme that polymerizes a glycosaminoglycan polysaccharide chain composed of alternating glucuronic acid and N-acetylglucosamine sugars,  $\beta$  1,3 and  $\beta$  1,4 linked. The term "seHAS" describes the HAS enzyme  
5 derived from *Streptococcus equisimilis*.

The present invention concerns the isolation and characterization of a hyaluronate hyaluronic acid synthase gene, cDNA, and gene product (HAS), as may be used for the polymerization of glucuronic acid and N-acetylglucosamine into the  
10 glycosaminoglycan hyaluronic acid. The present invention identifies the seHAS locus and discloses the nucleic acid sequence which encodes for the enzymatically active seHAS gene from *Streptococcus equisimilis*. The HAS gene also provides a new probe to assess the potential of bacterial specimens to produce  
15 hyaluronic acid.

Through the application of techniques and knowledge set forth herein, those of skill in the art will be able to obtain nucleic acid segments encoding the seHAS gene. As those of skill in the art will recognize, in light of the present disclosure, these  
20 advantages provide significant utility in being able to control the expression of the seHAS gene and control the nature of the seHAS gene product, the seHAS enzyme, that it is produced.

Accordingly, the invention is directed to the isolation of a purified nucleic acid segment which has a coding region encoding  
25 enzymatically active HAS, whether it be from prokaryotic or eukaryotic sources. This is possible because the enzyme, and

indeed the gene, is one found in both eukaryotes and some prokaryotes. Eukaryotes are also known to produce HA and thus have HA synthase genes that can be employed in connection with the invention.

5 HA synthase-encoding nucleic acid segments of the present invention are defined as being isolated free of total chromosomal or genomic DNA such that they may be readily manipulated by recombinant DNA techniques. Accordingly, as used herein, the phrase "a purified nucleic acid segment" refers to a DNA segment  
10 isolated free of unrelated chromosomal or genomic DNA and retained in a state rendering it useful for the practice of recombinant techniques, such as DNA in the form of a discrete isolated DNA fragment, or a vector (e.g., plasmid, phage or virus) incorporating such a fragment.

15 A preferred embodiment of the present invention is a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS. In particular, the purified nucleic acid segment encodes the scHAS of SEQ ID NO:2 or the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID  
20 NO:1.

Another embodiment of the present invention comprises a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS and the purified nucleic acid segment is capable of hybridizing to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1.

25 The present invention also comprises a natural or recombinant vector consisting of a plasmid, cosmid, phage, or virus vector.

The recombinant vector may also comprise a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS.

In particular, the purified nucleic acid segment encodes the seHAS of SEQ ID NO:2 or the purified nucleic acid segment comprises

5 a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1. If the recombinant vector is a plasmid, it may further comprise an expression vector. The expression vector may also include a promoter operatively linked to the enzymatically active HAS coding region.

10 In another preferred embodiment, the present invention comprises a recombinant host cell such as a prokaryotic cell transformed with a recombinant vector. The recombinant vector includes a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS. In particular, the purified  
15 nucleic acid segment encodes the seHAS of SEQ ID NO:2 or the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1.

The present invention also comprises a recombinant host cell, such as an eukaryotic cell transfected with a recombinant vector  
20 comprising a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS. In particular, the purified nucleic acid segment encodes the seHAS of SEQ ID NO:2 or the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1. The concept is to create a  
25 specifically modified seHAS gene that encodes an enzymatically

active HAS capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified structure or a modified size distribution.

The present invention further comprises a recombinant host cell which is electroporated to introduce a recombinant vector into the recombinant host cell. The recombinant vector may include a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS. In particular, the purified nucleic acid segment encodes the seHAS of SEQ ID NO:2 or the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1. The enzymatically active HAS may also be capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified structure or a modified size distribution.

In yet another preferred embodiment, the present invention comprises a recombinant host cell which is transduced with a recombinant vector which includes a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS. In particular, the purified nucleic acid segment encodes the seHAS of SEQ ID NO:2 or the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1. The enzymatically active HAS is also capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified structure or a modified size distribution.

The present invention also comprises a purified composition, wherein the purified composition comprises a polypeptide having a coding region encoding enzymatically active HAS and further having an amino acid sequence in accordance with SEQ ID NO:2.



In another embodiment, the invention comprises a method for detecting a DNA species, comprising the steps of: (1) obtaining a DNA sample; (2) contacting the DNA sample with a purified nucleic acid segment in accordance with SEQ ID NO:1; (3) hybridizing the DNA sample and the purified nucleic acid segment thereby forming a hybridized complex; and (4) detecting the complex.

The present invention also comprises a method for detecting a bacterial cell that expresses mRNA encoding seHAS, comprising the steps of: (1) obtaining a bacterial cell sample; (2) contacting at least one nucleic acid from the bacterial cell sample with purified nucleic acid segment in accordance with SEQ ID NO:1; (3) hybridizing the at least one nucleic acid and the purified nucleic acid segment thereby forming a hybridized complex; and (4) detecting the hybridized complex wherein the presence of the hybridized complex is indicative of a bacterial strain that expresses mRNA encoding seHAS.

The present invention also comprises methods for detecting the presence of either seHAS or spHAS in a cell. In particular, the method comprises using the oligonucleotides set forth in Seq. ID Nos.: 3-8 as probes. These oligonucleotides would allow a practitioner to search and detect the presence of seHAS or spHAS in a cell.

The present invention further comprises a method for producing hyaluronic acid, comprising the steps of: (1) introducing a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS into a host organism, wherein the host

organism contains nucleic acid segments encoding enzymes which produce UDP-GlcNAc and UDP-GlcA; (2) growing the host organism in a medium to secrete hyaluronic acid; and (3) recovering the secreted hyaluronic acid.

5       The method may also include the step of extracting the secreted hyaluronic acid from the medium as well as the step of purifying the extracted hyaluronic acid. Furthermore, the host organism may secrete a structurally modified hyaluronic acid or a size modified hyaluronic acid.

10       The present invention further comprises a pharmaceutical composition comprising a preselected pharmaceutical drug and an effective amount of hyaluronic acid produced by a recombinant HAS. The pharmaceutical composition may have a hyaluronic acid having a modified molecular weight pharmaceutical composition capable of  
15       evading an immune response. The modified molecular weight may also produce a pharmaceutical composition capable of targeting a specific tissue or cell type within the patient having an affinity for the modified molecular weight pharmaceutical composition.

      The present invention also comprises a purified and isolated  
20       nucleic acid sequence encoding enzymatically active seHAS, where the nucleic acid sequence is (a) the nucleic acid sequence in accordance with SEQ ID NO:1; (b) complementary nucleic acid sequences to the nucleic acid sequence in accordance with SEQ ID NO:1; (c) nucleic acid sequences which will hybridize to the  
25       nucleic acid in accordance with SEQ ID NO:1; and (d) nucleic acid

sequences which will hybridize to the complementary nucleic acid sequences of SEQ ID NO:1.

The present invention further comprises a purified and isolated nucleic acid segment consisting essentially of a nucleic acid segment encoding enzymatically active HAS.

The present invention also comprises an isolated nucleic acid segment consisting essentially of a nucleic acid segment encoding seHAS having a nucleic acid segment sufficiently duplicative of the nucleic acid segment in accordance of SEQ ID NO:1 to allow possession of the biological property of encoding for an enzymatically active HAS. The nucleic acid segment may also be a cDNA sequence.

The present invention also comprises a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS, wherein the purified nucleic acid segment is capable of hybridizing to the nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE SEVERAL VIEWS OF THE DRAWINGS

FIG. 1 depicts that cross hybridization between seHAS and spHAS genes does not occur.

FIG. 2 figuratively depicts the relatedness of seHAS to the bacterial and eukaryotic HAS proteins.

FIG. 3 figuratively depicts evolutionary relationships among some of the known hyaluronan synthases.

FIG. 4 depicts the HA size distribution produced by various engineered Streptococcal HAS enzymes.

FIG. 5 figuratively depicts the overexpression of recombinant seHAS and spHAS in *E. coli*.

FIG. 6 depicts purification of Streptococcal HA synthase.

FIG. 7 depicts a gel filtration analysis of HA synthesized by recombinant streptococcal HAS expressed in yeast membranes.

FIG. 8 is a Western blot analysis of recombinant seHAS using specific antibodies.

FIG. 9 is a kinetic analysis of the HA size distributions produced by recombinant seHAS and spHAS.

FIG. 10 graphically depicts the hydropathy plots for seHAS and predicted membrane associated regions.

FIG. 11 is a graphical model for the topologic organization of seHAS in the membrane.

FIG. 12 is a demonstration of the synthesis of authentic HA by the recombinant seHAS.

FIG. 13 depicts the recognition of nucleic acid sequences encoding seHAS, encoding spHAS, or encoding both seHAS and spHAS using specific oligonucleotides and PCR.

FIG. 14 depicts oligonucleotides used for specific PCR hybridization.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Before explaining at least one embodiment of the invention in detail, it is to be understood that the invention is not limited in its application to the details of construction and the arrangement of the components set forth in the following description or illustrated in the drawings. The invention is capable of other

embodiments or of being practiced or carried out in various ways. Also, it is to be understood that the phraseology and terminology employed herein is for purpose of description and should not be regarded as limiting.

5 As used herein, the term "nucleic acid segment" and "DNA segment" are used interchangeably and refer to a DNA molecule which has been isolated free of total genomic DNA of a particular species. Therefore, a "purified" DNA or nucleic acid segment as used herein, refers to a DNA segment which contains a Hyaluronate  
10 Synthase ("HAS") coding sequence that is isolated away from, or purified free from, unrelated genomic DNA, for example, total *Streptococcus equisimilis* or, for example, mammalian host genomic DNA. Included within the term "DNA segment", are DNA segments and smaller fragments of such segments and also recombinant vectors,  
15 including, for example, plasmids, cosmids, phage, viruses, and the like.

Similarly, a DNA segment comprising an isolated or purified seHAS gene refers to a DNA segment including HAS coding sequences isolated substantially away from other naturally occurring genes or  
20 protein encoding sequences. In this respect, the term "gene" is used for simplicity to refer to a functional protein, polypeptide or peptide encoding unit. As will be understood by those in the art, this functional term includes genomic sequences, cDNA sequences or combinations thereof. "Isolated substantially away  
25 from other coding sequences" means that the gene of interest, in this case seHAS, forms the significant part of the coding region of

the DNA segment, and that the DNA segment does not contain large portions of naturally-occurring coding DNA, such as large chromosomal fragments or other functional genes or DNA coding regions. Of course, this refers to the DNA segment as originally  
5 isolated, and does not exclude genes or coding regions later added to, or intentionally left in the segment by the hand of man.

Due to certain advantages associated with the use of prokaryotic sources, one will likely realize the most advantages upon isolation of the HAS gene from prokaryotes such as *S.*  
10 *pyogenes*, *S. equisimilis*, or *P. multocida*. One such advantage is that, typically, eukaryotic enzymes may require significant post-translational modifications that can only be achieved in a eukaryotic host. This will tend to limit the applicability of any eukaryotic HA synthase gene that is obtained. Moreover, those of  
15 ordinary skill in the art will likely realize additional advantages in terms of time and ease of genetic manipulation where a prokaryotic enzyme gene is sought to be employed. These additional advantages include (a) the ease of isolation of a prokaryotic gene because of the relatively small size of the genome and, therefore,  
20 the reduced amount of screening of the corresponding genomic library and (b) the ease of manipulation because the overall size of the coding region of a prokaryotic gene is significantly smaller due to the absence of introns. Furthermore, if the product of the seHAS gene (i.e., the enzyme) requires posttranslational  
25 modifications, these would best be achieved in a similar

prokaryotic cellular environment (host) from which the gene was derived.

Preferably, DNA sequences in accordance with the present invention will further include genetic control regions which allow the expression of the sequence in a selected recombinant host. Of course, the nature of the control region employed will generally vary depending on the particular use (e.g., cloning host) envisioned.

In particular embodiments, the invention concerns isolated DNA segments and recombinant vectors incorporating DNA sequences which encode a HAS gene, that include within its amino acid sequence an amino acid sequence in accordance with SEQ ID NO:2. Moreover, in other particular embodiments, the invention concerns isolated DNA segments and recombinant vectors incorporating DNA sequences which encode a gene that includes within its amino acid sequence the amino acid sequence of an HAS gene or DNA, and in particular to an HAS gene or cDNA, corresponding to *Streptococcus equisimilis* HAS. For example, where the DNA segment or vector encodes a full length HAS protein, or is intended for use in expressing the HAS protein, preferred sequences are those which are essentially as set forth in SEQ ID NO:2.

Nucleic acid segments having HA synthase activity may be isolated by the methods described herein. The term "a sequence essentially as set forth in SEQ ID NO:2" means that the sequence substantially corresponds to a portion of SEQ ID NO:2 and has relatively few amino acids which are not identical to, or a

biologically functional equivalent of, the amino acids of SEQ ID NO:2. The term "biologically functional equivalent" is well understood in the art and is further defined in detail herein, as a gene having a sequence essentially as set forth in SEQ ID NO:2, and that is associated with the ability of prokaryotes to produce HA or a hyaluronic acid coat.

For instance, the seHAS and spHAS coding sequences are approximately 70% identical and rich in the bases adenine (A) and thymine (T). SeHAS base content is A-26.71%, C-19.13%, G-20.81%, and T-33.33% (A/T = 60%). Whereas spHAS is A-31.34%, C-16.42%, G-16.34%, and T-35.8% (A/T = 67%). Those of ordinary skill in the art would be surprised that the seHAS coding sequence does not hybridize with the spHAS gene and vice versa, despite their being 70% identical. This unexpected inability to cross-hybridize could be due to short interruptions of mismatched bases throughout the open reading frames. The inability of spHAS and seHAS to cross-hybridize is shown in FIG. 1. The longest stretch of identical nucleotides common to both the seHAS and the spHAS coding sequences is only 20 nucleotides. In addition, the very A-T rich sequences will form less stable hybridization complexes than G-C rich sequences. Another possible explanation could be that there are several stretches of As or Ts in both sequences that could hybridize in a misaligned and unstable manner. This would put the seHAS and spHAS gene sequences out of frame with respect to each other, thereby decreasing the probability of productive hybridization.



Because of this unique phenomena of two genes encoding proteins which are 70% identical ~~not~~ being capable of cross-hybridizing to one another, it is beneficial to think of the claimed nucleic acid segment in terms of its function; i.e. a nucleic acid segment which encodes enzymatically active hyaluronate synthase. One of ordinary skill in the art would appreciate that a nucleic acid segment encoding enzymatically active hyaluronate synthase may contain conserved or ~~semi~~-conserved substitutions to the sequences set forth in SEQ ID NOS: 1 and 2 and yet still be within the scope of the invention.

In particular, the art is replete with examples of practitioners ability to make structural changes to a nucleic acid segment (i.e. encoding conserved or semi-conserved amino acid substitutions) and still preserve its enzymatic or functional activity. See for example: (1) Risler et al. "Amino Acid Substitutions in Structurally Related Proteins. A Pattern Recognition Approach." J. Mol. Biol. 204:1019-1029 (1988) ["... according to the observed exchangeability of amino acid side chains, only four groups could be delineated; (i) Ile and Val; (ii) Leu and Met, (iii) Lys, Arg, and Gln, and (iv) Tyr and Phe."]; (2) Niefind et al. "Amino Acid Similarity Coefficients for Protein Modeling and Sequence Alignment Derived from Main-Chain Folding Anoles." J. Mol. Biol. 219:481-497 (1991) [similarity parameters allow amino acid substitutions to be designed]; and (3) Overington et al. "Environment-Specific Amino Acid Substitution Tables: Tertiary Templates and Prediction of Protein Folds," Protein

Science 1:216-226 (1992) ["Analysis of the pattern of observed substitutions as a function of local environment shows that there are distinct patterns..." Compatible changes can be made.]

5        These references and countless others, indicate that one of ordinary skill in the art, given a nucleic acid sequence, could make substitutions and changes to the nucleic acid sequence without changing its functionality. Also, a substituted nucleic acid segment may be highly identical and retain its enzymatic activity with regard to its unadulterated parent, and yet still fail to  
10        hybridize thereto.

      The invention discloses nucleic acid segments encoding enzymatically active hyaluronate synthase - seHAS and spHAS. Although seHAS and spHAS are 70% identical and both encode enzymatically active hyaluronate synthase, they do not cross  
15        hybridize. Thus, one of ordinary skill in the art would appreciate that substitutions can be made to the seHAS nucleic acid segment listed in SEQ ID NO: 1 without deviating outside the scope and claims of the present invention. Standardized and accepted functionally equivalent amino acid substitutions are presented in  
20        Table I.

TABLE

Amino Acid Group	Conservative and Semi-conservative Substitutions
NonPolar R Groups	Ala—ne, Valine, Leucine, Iso—ucine, Proline, Methionine, Phe—lalanine, Tryptophan
Polar, but uncharged, R Groups	Gly—ne, Serine, Threonine, Cys—ine, Asparagine, Glutamine
Negatively Charged R Groups	Asp—tic Acid, Glutamic Acid
Positively Charged R Groups	Lys—e, Arginine, Histidine

Another preferred embodiment of the present invention is a purified nucleic acid segment that encodes a protein in accordance with SEQ ID NO:2, further defined as a recombinant vector. As used herein, the term "recombinant vector" refers to a vector that has been modified to contain a nucleic acid segment that encodes an HAS protein, or fragment thereof. The recombinant vector may be further defined as an expression vector comprising a promoter operatively linked to said HAS encoding nucleic acid segment.

A further preferred embodiment of the present invention is a host cell, made recombinant with a recombinant vector comprising an HAS gene. The preferred recombinant host cell may be a prokaryotic cell. In another embodiment, the recombinant host cell is a eukaryotic cell. As used herein, the term "engineered" or "recombinant" cell is intended to refer to a cell into which a recombinant gene, such as a gene encoding HAS, has been introduced. Therefore, engineered cells are distinguishable from naturally occurring cells which do not contain a recombinantly introduced gene. Engineered cells are thus cells having a gene or genes

introduced through the hand of man. Recombinantly introduced genes will either be in the form of a cDNA gene, a copy of a genomic gene, or will include genes positioned adjacent to a promoter not naturally associated with the particular introduced gene.

5       Where one desires to use a host other than *Streptococcus*, as may be used to produce recombinant HA synthase, it may be advantageous to employ a prokaryotic system such as *E. coli*, *B. subtilis*, *Lactococcus* sp., or even eukaryotic systems such as yeast or Chinese hamster ovary, African green monkey kidney cells, VERO  
10   cells, or the like. Of course, where this is undertaken it will generally be desirable to bring the HA synthase gene under the control of sequences which are functional in the selected alternative host. The appropriate DNA control sequences, as well as their construction and use, are generally well known in the art  
15   as discussed in more detail hereinbelow.

      In preferred embodiments, the HA synthase-encoding DNA segments further include DNA sequences, known in the art functionally as origins of replication or "replicons", which allow replication of contiguous sequences by the particular host. Such  
20   origins allow the preparation of extrachromosomally localized and replicating chimeric segments or plasmids, to which HA synthase DNA sequences are ligated. In more preferred instances, the employed origin is one capable of replication in bacterial hosts suitable for biotechnology applications. However, for more versatility of  
25   cloned DNA segments, it may be desirable to alternatively or even

additionally employ origins recognized by other host systems whose use is contemplated (such as in a shuttle vector).

The isolation and use of other replication origins such as the SV40, polyoma or bovine papillomavirus origins, which may be employed for cloning or expression in a number of higher organisms, are well known to those of ordinary skill in the art. In certain embodiments, the invention may thus be defined in terms of a recombinant transformation vector which includes the HA synthase coding gene sequence together with an appropriate replication origin and under the control of selected control regions.

Thus, it will be appreciated by those of skill in the art that other means may be used to obtain the HAS gene or cDNA, in light of the present disclosure. For example, polymerase chain reaction or RT-PCR produced DNA fragments may be obtained which contain full complements of genes or cDNAs from a number of sources, including other strains of *Streptococcus* or from eukaryotic sources, such as cDNA libraries. Virtually any molecular cloning approach may be employed for the generation of DNA fragments in accordance with the present invention. Thus, the only limitation generally on the particular method employed for DNA isolation is that the isolated nucleic acids should encode a biologically functional equivalent HA synthase.

Once the DNA has been isolated it is ligated together with a selected vector. Virtually any cloning vector can be employed to realize advantages in accordance with the invention. Typical useful vectors include plasmids and phages for use in prokaryotic

organisms and even viral vectors for use in eukaryotic organisms. Examples include pKK223-3, pSA3, recombinant lambda, SV40, polyoma, adenovirus, bovine papilloma virus and retroviruses. However, it is believed that particular advantages will ultimately be realized where vectors capable of replication in both *Lactococcus* or *Bacillus* strains and *E. coli* are employed.

Vectors such as these, exemplified by the pSA3 vector of Dao and Ferretti or the pAT19 vector of Trieu-Cuot, et al., allow one to perform clonal colony selection in an easily manipulated host such as *E. coli*, followed by subsequent transfer back into a food grade *Lactococcus* or *Bacillus* strain for production of HA. These are benign and well studied organisms used in the production of certain foods and biotechnology products. These are advantageous in that one can augment the *Lactococcus* or *Bacillus* strain's ability to synthesize HA through gene dosaging (i.e., providing extra copies of the HA synthase gene by amplification) and/or inclusion of additional genes to increase the availability of HA precursors. The inherent ability of a bacterium to synthesize HA can also be augmented through the formation of extra copies, or amplification, of the plasmid that carries the HA synthase gene. This amplification can account for up to a 10-fold increase in plasmid copy number and, therefore, the HA synthase gene copy number.

Another procedure that would further augment HA synthase gene copy number is the insertion of multiple copies of the gene into the plasmid. Another technique would include integrating the HAS

gene into chromosomal DNA. This extra amplification would be especially feasible, since the bacterial HA synthase gene size is small. In some scenarios, the chromosomal DNA-ligated vector is employed to transfect the host that is selected for clonal  
5 screening purposes such as *E. coli* through the use of a vector that is capable of expressing the inserted DNA in the chosen host.

Where a eukaryotic source such as dermal or synovial fibroblasts or rooster comb cells is employed, one will desire to proceed initially by preparing a cDNA library. This is carried out  
10 first by isolation of mRNA from the above cells, followed by preparation of double stranded cDNA using an enzyme with reverse transcriptase activity and ligation with the selected vector. Numerous possibilities are available and known in the art for the preparation of the double stranded cDNA, and all such techniques  
15 are believed to be applicable. The preferred technique involves reverse transcription. Once a population of double stranded cDNAs is obtained, a cDNA library is prepared in the selected host by accepted techniques, such as by ligation into the appropriate vector and amplification in the appropriate host. Due to the high  
20 number of clones that are obtained, and the relative ease of screening large numbers of clones by the techniques set forth herein, one may desire to employ phage expression vectors, such as  $\lambda$ gt11,  $\lambda$ gt12,  $\lambda$ Gem11, and/or  $\lambda$ ZAP for the cloning and expression screening of cDNA clones.

25 In certain other embodiments the invention concerns isolated DNA segments and recombinant vectors that include within their

sequence a nucleic acid sequence essentially as set forth in SEQ ID NO:1. The term "essentially as set forth in SEQ ID NO:1" is used in the same sense as described above and means that the nucleic acid sequence substantially corresponds to a portion of SEQ ID NO:1, and has relatively few codons which are not identical, or functionally equivalent, to the codons of SEQ ID NO:1. The term "functionally equivalent codon" is used herein to refer to codons that encode the same amino acid, such as the six codons for arginine or serine, as set forth in Table I, and also refers to codons that encode biologically equivalent amino acids.

It will also be understood that amino acid and nucleic acid sequences may include additional residues, such as additional N- or C-terminal amino acids or 5' or 3' nucleic acid sequences, and yet still be essentially as set forth in one of the sequences disclosed herein, so long as the sequence meets the criteria set forth above, including the maintenance of biological protein activity where protein expression and enzyme activity is concerned. The addition of terminal sequences particularly applies to nucleic acid sequences which may, for example, include various non-coding sequences flanking either of the 5' or 3' portions of the coding region or may include various internal sequences, which are known to occur within genes. In particular, the amino acid sequence of the HAS gene in eukaryotes appears to be 40% larger than that found in prokaryotes.

Allowing for the degeneracy of the genetic code as well as conserved and semi-conserved substitutions, sequences which have



between about 40% and about 80%; or more preferably, between about 80% and about 90%; or even more preferably, between about 90% and about 99%; of nucleotides which are identical to the nucleotides of SEQ ID NO:1 will be sequences which are "essentially as set forth in SEQ ID NO:1". Sequences which are essentially the same as those set forth in SEQ ID NO:1 may also be functionally defined as sequences which are capable of hybridizing to a nucleic acid segment containing the complement of SEQ ID NO:1 under standard or less stringent hybridizing conditions. Suitable standard hybridization conditions will be well known to those of skill in the art and are clearly set forth herein.

The term "standard hybridization conditions" as used herein, is used to describe those conditions under which substantially complementary nucleic acid segments will form standard Watson-Crick base-pairing. A number of factors are known that determine the specificity of binding or hybridization, such as pH, temperature, salt concentration, the presence of agents, such as formamide and dimethyl sulfoxide, the length of the segments that are hybridizing, and the like. When it is contemplated that shorter nucleic acid segments will be used for hybridization, for example fragments between about 14 and about 100 nucleotides, salt and temperature preferred conditions for hybridization will include 1.2-1.8 x HPB at 40-50°C.

Naturally, the present invention also encompasses DNA segments which are complementary, or essentially complementary, to the sequence set forth in SEQ ID NO:1. Nucleic acid sequences which

are "complementary" are those which are capable of base-pairing according to the standard Watson-Crick complementarity rules. As used herein, the term "complementary sequences" means nucleic acid sequences which are substantially complementary, as may be assessed  
5 by the same nucleotide comparison set forth above, or as defined as being capable of hybridizing to the nucleic acid segment of SEQ ID NO:1.

The nucleic acid segments of the present invention, regardless of the length of the coding sequence itself, may be combined with  
10 other DNA sequences, such as promoters, polyadenylation signals, additional restriction enzyme sites, multiple cloning sites, epitope tags, poly histidine regions, other coding segments, and the like, such that their overall length may vary considerably. It is therefore contemplated that a nucleic acid fragment of almost  
15 any length may be employed, with the total length preferably being limited by the ease of preparation and use in the intended recombinant DNA protocol.

Naturally, it will also be understood that this invention is not limited to the particular nucleic acid and amino acid sequences  
20 of SEQ ID NO:1 and 2. Recombinant vectors and isolated DNA segments may therefore variously include the HAS coding regions themselves, coding regions bearing selected alterations or modifications in the basic coding region, or they may encode larger polypeptides which nevertheless include HAS-coding regions or may  
25 encode biologically functional equivalent proteins or peptides which have variant amino acids sequences.

For instance, we have found, characterized, and purified hyaluronate synthase in two other systems: (a) the gram-negative bacteria *Pasturella multocida* (SEQ ID NO:19); and (2) chlorella virus PBCV-1 (SEQ ID NOS:7 and 8). The presence of hyaluronan synthase in these two systems and our ability to purify and use the hyaluronan synthase from these two different systems indicates our ability to purify and isolate nucleic acid sequences encoding enzymatically active hyaluronan synthase.

The capsule of Carter Type A *P. multocida* (SEQ ID NO:19) was long suspected of containing hyaluronic acid-HA. Characterization of the HA synthase of *P. multocida* led to interesting enzymological differences between it and the seHAS and spHAS proteins.

*P. multocida* cells produce a readily visible extracellular HA capsule, and since the two streptococcal HASs are membrane proteins, membrane preparations of the fowl cholera pathogen were tested. In early trials, crude membrane fractions derived from ultrasonication alone possessed very low levels of UDP-GlcNAc-dependent UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA incorporation into HA[~0.2 pmol of GlcA transfer (μg of proteins)<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>] when assayed under conditions similar to those for measuring streptococcal HAS activity. The enzyme from *E. coli* with the recombinant *hasA* plasmid was also recalcitrant to isolation at first. These results were in contrast to the easily detectable amounts obtained from *Streptococcus* by similar methods.

An alternative preparation protocol using ice-cold lysozyme treatment in the presence of protease inhibitors in conjunction with ultrasonication allowed the substantial recovery of HAS

activity from both species of Gram-negative bacteria. Specific activities for HAS of 5-10 pmol of GlcA transferred ( $\mu\text{g}$  of protein) $^{-1}\text{h}^{-1}$  were routinely obtained for crude membranes of wild-type *P. multocida* with the new method. In the absence of UDP-GlcNAc, virtually no radioactivity (<1% of identical assay with both sugar precursors) from UDP- $^{14}\text{C}$ GlcA was incorporated into higher molecular weight material. Membranes prepared from the acapsular mutant, TnA, possessed no detectable HAS activity when supplemented with both sugar nucleotide precursors (data not shown). Gel-filtration analysis using a Sephacryl S-200 column indicates that the molecular mass of the majority of the  $^{14}\text{C}$ -labeled product synthesized *in vitro* is  $\geq 8 \times 10^4$  Da since the material elutes in the void volumes, such a value corresponds to a HA molecule composed of at least 400 monomers. This product is sensitive to *Streptomyces* hyaluronidase digestion but resistant to protease treatment.

The parameters of the HAS assay were varied to maximize incorporation of UDP-sugars into polysaccharide by *P. multocida* membranes. Streptococcal sPHAS requires  $\text{Mg}^{2+}$  and therefore this metal ion was included in the initial assays of *P. multocida* membranes. The *P. multocida* HAS (pmHAS) was relatively active from pH 6.5 to 8.6 in Tris-type buffers with an optimum at pH 7. The HAS activity was linear with respect to the incubation time at neutral pH for at least 1 h. The pmHAS was apparently less active at higher ionic strengths because the addition of 100 mM NaCl to

the reaction containing 50 mM Tris pH 7, and 20 mM MgCl<sub>2</sub>, reduced sugar incorporation by ~50%.

The metal ion specificity of the pmHAS was assessed at pH 7. Under metal-free conditions in the presence of EDTA, no incorporation of radiolabeled precursor into polysaccharide was detectable (<0.5% of maximal signal). Mn<sup>2+</sup> gave the highest incorporation rates at the lowest ion concentrations for the tested metals (Mg, Mn, Co, Cu, and Ni). Mg<sup>2+</sup> gave about 50% of the Mn<sup>2+</sup> stimulation but at 10-fold higher concentrations. Co<sup>2+</sup> or Ni<sup>2+</sup> at 10mM supported lower levels of activity (20% or 9%, respectively, of 1 mM Mn<sup>2+</sup> assays), but membranes supplied with 10 mM Cu<sup>2+</sup> were inactive. Indeed, mixing 10 mM Cu<sup>2+</sup> and 20 mM Mg<sup>2+</sup> with the membrane preparation resulted in almost no incorporation of label into polysaccharide (<0.8% of Mg-only value).

Initial characterization of the pmHAS was performed in the presence of Mg<sup>2+</sup>. The binding affinity of the enzyme for its sugar nucleotide precursors was assessed by measuring the apparent K<sub>m</sub> value. Incorporation of [<sup>14</sup>C]GlcA or [<sup>3</sup>H]GlcNAc into polysaccharide was monitored at varied concentrations of UDP-GlcNAc or UDP-GlcA, respectively. In Mg<sup>2+</sup>-containing buffers, the apparent K<sub>m</sub> values of ~20 μM for UDP-GlcA and ~75 μM for UDP-GlcNAc were determined utilizing Hanes-Woolf plots ([S] / versus [S]) of the titration data. The V<sub>max</sub> values for both sugars were the same because the slopes, corresponding to 1/V<sub>max</sub>, of the Hanes-Woolf plots were equivalent. In comparison to results from assays with Mg<sup>2+</sup>, the K<sub>m</sub>

value for UDP-GlcNAc was increased by about 25-50% to  $\sim 105 \mu\text{M}$  and the  $V_{\text{max}}$  increased by a factor of 2-3-fold in the presence of  $\text{Mn}^{2+}$ .

The HA synthase enzymes from either *P. multocida*, *S. equisimilis*, or *S. pyogenes* utilizes UDP-sugars, but they possess somewhat different kinetic optima with respect to pH and metal ion dependence and  $K_m$  values. The enzymes are most active at pH 7; however, the pmHAS reportedly displays more activity at slightly acidic pH and is relatively inactive above pH 7.4. The pmHAS utilizes  $\text{Mn}^{2+}$  more efficiently than  $\text{Mg}^{2+}$  under the *in vitro* assay conditions, but the identity of the physiological metal cofactor in the bacterial cell is unknown. In comparison, in previous studies with the streptococcal enzyme,  $\text{Mg}^{2+}$  was much better than  $\text{Mn}^{2+}$  but the albeit smaller effect of  $\text{Mn}^{2+}$  was maximal at  $\sim 10$ -fold lower concentrations than the optimal  $\text{Mg}^{2+}$  concentration. The pmHAS apparently binds the UDP-sugars more tightly than spHAS. The measured  $K_m$  values for the pmHAS in crude membranes are about 2-3-fold lower for each substrate than those obtained from the HAS found in streptococcal membranes: 50 or 39  $\mu\text{M}$  for UDP-GlcA and 500 or 150  $\mu\text{M}$  for UDP-GlcNAc, respectively.

By kinetic analyses, the  $V_{\text{max}}$  of the pmHAS was 2-3-fold higher in the presence of  $\text{Mn}^{2+}$  than  $\text{Mg}^{2+}$ , but the UDP-GlcNAc  $K_m$  value was increased slightly in assays with the former ion. This observation of apparent lowered affinity suggests that the increased polymerization rate was not due to better binding of the  $\text{Mn}^{2+}$  ion/sugar nucleotide complex to the enzyme active site(s). Therefore, it is possible that  $\text{Mn}^{2+}$  enhances some other reaction

step, alters another site/structure of the enzyme, or modifies the phospholipid membrane environment. The gene sequence and the protein sequence of pmHAS are shown in SEQ ID NO:19.

Chlorella virus PBCV-1 encodes a functional glycosyltransferase that can synthesize a polysaccharide, hyaluronan [hyaluronic acid, HA]. This finding is contrary to the general observation that viruses either: (a) utilize host cell glycosyltransferases to create new carbohydrate structures, or (b) accumulate host cell glycoconjugates during virion maturation. Furthermore, HA has been generally regarded as restricted to animals and a few of their virulent bacterial pathogens. Though many plant carbohydrates have been characterized, neither HA nor a related analog has previously been detected in cells of plants or protists.

The vertebrate HAS enzymes (DG2, HAS1, HAS2, HAS3) and streptococcal HasA enzymes (spHAS and seHAS) have several regions of sequence similarity. While sequencing the double-stranded DNA genome of virus PBCV-1 [*Paramecium bursaria* chlorella virus], an ORF [open reading frame], A98R (Accession #442580), encoding a 567 residue protein with 28 to 33% amino acid identity to the various HASs was discovered. This protein is designated cvHAS (chlorella virus HA synthase). The gene sequence encoding PBCV-1 and its protein sequence are shown in SEQ ID NOS:7 and 8.

PBCV-1 is the prototype of a family (Phycodnaviridae) of large (175-190 nm diameter) polyhedral, plaque-forming viruses that replicate in certain unicellular, eukaryotic chlorella-like green

algae. PBCV-1 virions contain at least 50 different proteins and a lipid component located inside the outer glycoprotein capsid. The PBCV-1 genome is a linear, nonpermuted 330-kb dsDNA molecule with covalently closed hairpin ends.

5       Based on its deduced amino acid sequence, the A98R gene product should be an integral membrane protein. To test this hypothesis, recombinant A98R was produced in *Escherichia coli* and the membrane fraction was assayed for HAS activity. UDP-GlcA and UDP-GlcNAc were incorporated into the polysaccharide by the  
10       membrane fraction derived from cells containing the A98R gene on a plasmid, pCVHAS, (average specific activity 2.5 pmoles GlcA transfer/ $\mu$ g protein/min) but not by samples from control cells ( $<0.001$  pmoles GlcA transfer/ $\mu$ g protein/min). No activity was detected in the soluble fraction of cells transformed with pCVHAS.  
15       UDP-GlcA and UDP-GlcNAc were simultaneously required for polymerization. The activity was optimal in Hepes buffer at pH 7.2 in the presence of 10 mM  $MnCl_2$ , whereas no activity was detected if the metal ion was omitted.  $Mg^{2+}$  and  $Co^{2+}$  were ~20% as effective as  $Mn^{2+}$  at similar concentrations. The pmHAS has a similar metal  
20       requirement, but other HASs prefer  $Mg^{2+}$ .

      The recombinant A98R enzyme synthesized a polysaccharide with an average molecular weight of  $3-6 \times 10^6$  Da which is smaller than that of the HA synthesized by recombinant spHAS or DG42 xlHAS in  
25       vitro ( $\sim 10^7$  Da and  $\sim 5-8 \times 10^6$  Da, respectively; 13,15). The polysaccharide was completely degraded by *Streptomyces hyaluroniticus* HA lyase, an enzyme that depolymerizes HA, but not



structurally related glycosaminoglycans such as heparin and chondroitin.

PBCV-1 infected chlorella cells were examined for A98R gene expression. A ~1,700-nucleotide A98R transcript appeared at ~15 min post-infection and disappeared by 60 min after infection indicating that A98R is an early gene. Consequently, membrane fractions from uninfected and PBCV-1 infected chlorella cells were assayed at 50 and 90 min post-infection for HAS activity. Infected cells, but not uninfected cells, had activity. Like the bacterially derived recombinant A98R enzyme, radiolabel incorporation from UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA to polysaccharide depended on both Mn<sup>2+</sup> and UDP-GlcNAc. This radiolabeled product was also degraded by HA lyase. Disrupted PBCV-1 virions had no HAS activity.

PBCV-1 infected chlorella cells were analyzed for HA polysaccharide using a highly specific <sup>125</sup>I-labeled HA-binding protein. Extracts from cells at 50 and 90 min post-infection contained substantial amounts of HA, but not extracts from uninfected algae or disrupted PBCV-1 virions. The labeled HA-binding protein also interacted with intact infected cells at 50 and 90 min post-infection, but not healthy cells. Therefore, a considerable portion of the newly synthesized HA polysaccharide was immobilized at the outer cell surface of the infected algae. The extracellular HA does not play an obvious role in the interaction between the virus and its algal host because neither plaque size nor plaque number was altered by including either testicular

hyaluronidase (465 units/ml) or free HA polysaccharide (100 µg/ml) in the top agar of the PBCV-1 plaque assay.

The PBCV-1 genome also has additional genes that encode for an UDP-Glc dehydrogenase (UDP-Glc DH) and a glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase (GFAT). UDP-Glc DH converts UDP-Glc into UDP-GlcA, a required precursor for HA biosynthesis. GFAT converts fructose-6-phosphate into glucosamine-6-phosphate, an intermediate in the UDP-GlcNAc metabolic pathway. Both of these PBCV-1 genes, like the A98R HAS, are expressed early in infection and encode enzymatically active proteins. The presence of multiple enzymes in the HA biosynthesis pathway indicates that HA production must serve an important function in the life cycle of the chlorella viruses.

HA synthases of *Streptococcus*, vertebrates, and PBCV-1 possess many motifs of 2 to 4 residues that occur in the same relative order. These conserved motifs probably reflect domains crucial for HA biosynthesis as shown in FIG. 2. The protein sequences of Group C seHAS, Group A sphAS, murine HAS1, HAS2, HAS3, and frog HAS are shown aligned in FIG. 2. The alignment of FIG. 2 was accomplished using the DNAsis multiple alignment program. Residues in seHAS identical in other known HAS family members (including human HAS1 and 2, not shown) are denoted by shading and asterisks. The amino acids indicated by dots are conserved in all members of the larger β-glycosyl transferase family. The diamond symbol indicates the highly conserved cysteine residue that may be critical for enzyme activity. The approximate mid-points of predicted membrane domains

MD1 through MD7 are indicated with arrows. X1 indicates *Xeopus laevis*, and MM denotes *Mus musculus*.

Regions of similarity between HASs and other enzymes that synthesize  $\beta$ -linked polysaccharides from UDP-sugar precursors are also being discovered as more glycosyltransferases are sequenced. Examples include bacterial cellulose synthase, fungal and bacterial chitin synthases, and the various HASs. The significance of these similar structural motifs will become more apparent as the three-dimensional structures of glycosyltransferases accumulate.

FIG. 3 depicts the evolutionary relationships among the known hyaluronan synthase. The phylogenetic tree of FIG. 3 was generated by the Higgins-Sharp algorithm using the DNAsis multiple alignment program. The calculated matching percentages are indicated at each branch of the dendrogram.

The DNA segments of the present invention encompass biologically functional equivalent HAS proteins and peptides. Such sequences may arise as a consequence of codon redundancy and functional equivalency which are known to occur naturally within nucleic acid sequences and the proteins thus encoded. Alternatively, functionally equivalent proteins or peptides may be created via the application of recombinant DNA technology, in which changes in the protein structure may be engineered, based on considerations of the properties of the amino acids being exchanged. Changes designed by man may be introduced through the application of site-directed mutagenesis techniques, e.g., to introduce improvements to the enzyme activity or to antigenicity of the HAS

protein or to test HAS mutants in order to examine HA synthase activity at the molecular level.

Also, specific changes to the HAS coding sequence can result in the production of HA having a modified size distribution or structural configuration. One of ordinary skill in the art would appreciate that the HAS coding sequence can be manipulated in a manner to produce an altered hyaluronate synthase which in turn is capable of producing hyaluronic acid having differing polymer sizes and/or functional capabilities. For example, the HAS coding sequence may be altered in such a manner that the hyaluronate synthase has an altered sugar substrate specificity so that the hyaluronate synthase creates a new hyaluronic acid-like polymer incorporating a different structure such as a previously unincorporated sugar or sugar derivative. This newly incorporated sugar could result in a modified hyaluronic acid having different functional properties, a hyaluronic acid having a smaller or larger polymer size/molecular weight, or both. As will be appreciated by one of ordinary skill in the art given the HAS coding sequences, changes and/or substitutions can be made to the HAS coding sequence such that these desired property and/or size modifications can be accomplished. Table II lists sugar nucleotide specificity and magnesium ion requirement of recombinant seHAS.

TABLE I  
Sugar nucleotide specificity and  
Magnesium ion requirement of recombinant seHAS

5	Second Sugar nucleotide present ( $\mu$ M)	HA Synthesis*	
		UDP- $^{14}$ C]GlcA dpm (%)	UDP- $^3$ H]GlcNAc dpm (%)
10	None	90 (2.1%)	8 (1.2%)
	UDP-GlcNAc (300)	4134 (100%)	-----
	UDP-GlcA (120)	-----	635 (100%)
15	UDP-Glc (160)	81 (1.9%)	10 (1.5%)
	UDP-GalNAc (280)	74 (1.7%)	19 (2.9%)
20	UDP-GalA (150)	58 (1.4%)	19 (2.9%)
	UDP-GlcNAc + EDTA	31 (0.7%)	-----
25	UDP-GlcA + EDTA	-----	22 (3.4%)

\* Membranes (324 ng protein) were incubated at 37°C for 1 h with either 120  $\mu$ M UDP- $^{14}$ C]GlcA ( $2.8 \times 10^4$  dpm) or 300  $\mu$ M UDP- $^3$ H]GlcNAc ( $2 \times 10^4$  dpm). The radiolabeled sugar nucleotide was used in the presence of the indicated second nonlabeled sugar nucleotide. HA synthase activity was determined as described in the application.

The term "modified structure" as used herein denotes a hyaluronic acid polymer containing a sugar or derivative not normally found in the naturally occurring HA polysaccharide. The term "modified size distribution" refer to the synthesis of hyaluronic acid molecules of a size distribution not normally found with the native enzyme; the engineered size could be much smaller or larger than normal.

Various hyaluronic acid products of differing size have application in the areas of drug delivery and the generation of an

enzyme of altered structure can be combined with a hyaluronic acid of differing size. Applications in angiogenesis and wound healing are potentially large if hyaluronic acid polymers of about 20 monosaccharides can be made in good quantities. Another particular application for small hyaluronic acid oligosaccharides is in the stabilization of recombinant human proteins used for medical purposes. A major problem with such proteins is their clearance from the blood and a short biological half life. One present solution to this problem is to couple a small molecule shield that prevents the protein from being cleared from the circulation too rapidly. Very small molecular weight hyaluronic acid is well suited for this role and would be nonimmunogenic and biocompatible. Larger molecular weight hyaluronic acid attached to a drug or protein may be used to target the reticuloendothelial cell system which has endocytic receptors for hyaluronic acid.

One of ordinary skill in the art given this disclosure would appreciate that there are several ways in which the size distribution of the hyaluronic acid polymer made by the hyaluronate synthase could be regulated to give different sizes. First, the kinetic control of product size can be altered by decreasing temperature, decreasing time of enzyme action and by decreasing the concentration of one or both sugar nucleotide substrates. Decreasing any or all of these variables will give lower amounts and smaller sizes of hyaluronic acid product. The disadvantages of these approaches are that the yield of product will also be

decreased and it may be difficult to achieve reproducibility from day to day or batch to batch.

Secondly, the alteration of the intrinsic ability of the enzyme to synthesize a large hyaluronic acid product. Changes to the protein can be engineered by recombinant DNA technology, including  
5 substitution, deletion and addition of specific amino acids (or even the introduction of prosthetic groups through metabolic processing). Such changes that result in an intrinsically slower enzyme could then allow more reproducible control of hyaluronic acid size by  
10 kinetic means. The final hyaluronic acid size distribution is determined by certain characteristics of the enzyme, that rely on particular amino acids in the sequence. Among the 20% of residues absolutely conserved between the streptococcal enzymes and the eukaryotic hyaluronate synthases, there is a set of amino acids at  
15 unique positions that control or greatly influence the size of the hyaluronic acid polymer that the enzyme can make. Specific changes in any of these residues can produce a modified HAS that produces an HA product having a modified size distribution. Engineered changes to seHAS, spHAS, pmHAS, or cvHAS that decrease the intrinsic size of  
20 the hyaluronic acid that the enzyme can make before the hyaluronic acid is released, will provide powerful means to produce hyaluronic acid product of smaller or potentially larger size than the native enzyme.

Finally, larger molecular weight hyaluronic acid made be  
25 degraded with specific hyaluronidases to make lower molecular weight hyaluronic acid. This practice however, is very difficult to

achieve reproducibility and one must meticulously repurify the hyaluronic acid to remove the hyaluronidase and unwanted digestion products.

As shown in FIG. 4, hyaluronan synthase can be engineered to produce hyaluronic acid polymers of different size, in particular smaller, than the normal wildtype enzyme. The figure shows the distribution of HA sizes (in millions of Daltons, a measure of molecular weight) for a series of spHAS enzymes, each of which was engineered by site directed mutagenesis to have a single amino acid change from the native enzyme. Each has a different Cysteine residue replaced with Alanine. The cluster of five curves with open symbols represent the following spHAS proteins: wildtype, C124A, C261A, C366A, and C402A. The filled circles represent the poorly expressed C225A protein which is only partially active.

The filled triangles is the C280A spHAS protein, which is found to synthesize a much smaller range of HA polymers than the normal enzyme or the other variants shown. This reduction to practice shows that it is feasible to engineer the hyaluronate synthase enzyme to synthesize a desired range of HA product sizes. The seHAS, pmHAS, and cvHAS genes encoding hyaluronate synthase can also be manipulated by site directed mutagenesis to produce an enzyme which synthesizes a desired range of HA product sizes.

Structurally modified hyaluronic acid is no different conceptually than altering the size distribution of the hyaluronic acid product by changing particular amino acids in the desired HAS or the spHAS. Derivatives of UDP-GlcNAc, in which the N-acetyl



group is missing UDP-GlcN or replaced with another chemically useful group, are expected to be particularly useful. The strong substrate specificity must rely on a particular subset of amino acids among the 20% that are conserved. Specific changes to one or more of these residues creates a functionless synthase that interacts less specifically with one or more of the substrates than the native enzyme. This altered enzyme could then utilize alternate natural or special sugar nucleotides to incorporate sugar derivatives designed to allow different chemistries to be employed for the following purposes: (i) covalently coupling specific drugs, proteins, or toxins to the structurally modified hyaluronic acid for general or targeted drug delivery, radiological procedures, etc. (ii) covalently cross linking the hyaluronic acid itself or to other supports to achieve a gel, or other three dimensional biomaterial with stronger physical properties and (iii) covalently linking hyaluronic acid to a surface to create a biocompatible film or monolayer.

Bacteria can also be engineered to produce hyaluronic acid. For instance, we have created strains of *B. subtilis* containing the *spHAS* gene, as well as the gene for one of the sugar nucleotide precursors. We chose this bacterium since it is frequently used in the biotech industry for the production of products for human use. These bacteria were intended as first generation prototypes for the generation of a bacterium able to produce hyaluronic acid in larger amounts than presently available using a wild type natural strain. We put in multiple copies of these genes.

==

For example, three *Bacillus subtilis* strains were constructed to contain one or both of the *Streptococcus pyogenes* genes for hyaluronan synthase (*spHAS*) and UDP-glucose dehydrogenase, the results of which are shown in Table II-B. Based on a sensitive commercial radiometric assay to detect and quantitate HA, it was determined that the strain with both genes (strain #3) makes and secretes HA into the medium. The parent strain or the strain with just the dehydrogenase gene (strain #1) does not make HA. Strain #2, which contains just the *spHAS* gene alone makes HA, but only 10% of what strain #3 makes. Agarose gel electrophoresis showed that the HA secreted into the medium by strain #3 is very high molecular weight.

TABLE II-B

Strain Number	Cells	Medium(*)	Strain with genes	Cell density ( $A_{600}$ )
(μg HA per ml of culture)				
1	0	0	hasB	4.8
2	4	35	SpHAS	3.9
3	=>10	>250	SpHAS + hasB	3.2

(\*) Most HA is in media but some was cell-associated; HA was determined using the HA Test 50 kit from Pharmacia.

These experiments used the streptococcal promoters normally found with these genes to drive protein expression. It is expected that the construction of strains with the spHAS or seHAS reading frame under control of a *B. subtilis* promoter would yield even more superior results. The vector used is a Gram positive/*E. Coli* shuttle vector that has a medium copy number in *B. subtilis* and a gene for erythromycin resistance (enabling resistance to 8 µg/ml in *B. subtilis* or 175 µg/ml in *E. coli*). The *B. subtilis* host strain used is 1A1 from BGSC, which has a tryptophan requirement but otherwise is wildtype, and can sporulate. Cell growth and HA production was in Spizizens Minima Media plus tryptophan, glucose, trace elements and erythromycin (8 µg/ml). Growth was at 32 degrees Celsius with vigorous agitation until the medium was exhausted (~36 hours).

This demonstrates that these bioengineered cells, which would not normally make hyaluronic acid became competent to do so when they are transformed with the spHAS gene. The seHAS would also be capable of being introduced into non-hyaluronic acid producing bacteria to create a bioengineered bacterial strain capable of producing hyaluronic acid.

A preferred embodiment of the present invention is a purified composition comprising a polypeptide having an amino acid sequence in accordance with SEQ ID NO:2. The term "purified" as used herein, is intended to refer to an HAS protein composition, wherein the HAS protein or appropriately modified HAS protein (e.g. containing a [HIS]<sub>6</sub> tag) is purified to any degree relative to its naturally-

obtainable state, i.e., in this case, relative to its purity within a prokaryotic cell extract. HAS protein may be isolated from *Streptococcus*, *Pasturella*, *Chlorella* virus, patient specimens, recombinant cells, infected tissues, isolated subpopulation of tissues that contain high levels of hyaluronate in the extracellular matrix, and the like, as will be known to those of skill in the art, in light of the present disclosure. For instance, the recombinant seHAS or spHAS protein makes up approximately 10% of the total membrane protein of *E. coli*. A purified HAS protein composition therefore also refers to a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, free from the environment in which it may naturally occur (FIG. 5).

Turning to the expression of the seHAS gene whether from genomic DNA, or a cDNA, one may proceed to prepare an expression system for the recombinant preparation of the HAS protein. The engineering of DNA segment(s) for expression in a prokaryotic or eukaryotic system may be performed by techniques generally known to those of skill in recombinant expression.

HAS may be successfully expressed in eukaryotic expression systems, however, the inventors aver that bacterial expression systems can be used for the preparation of HAS for all purposes. It is believed that bacterial expression will ultimately have advantages over eukaryotic expression in terms of ease of use, cost of production, and quantity of material obtained thereby.

The purification of streptococcal hyaluronan synthase (seHAS and spHAS) is shown in Table III and FIG. 6. Fractions from various

stages of the purification scheme were analyzed by SDS-PAGE on a 12.5% gel, which was then stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lanes: molecular weight markers; 1, whole *E. coli* membranes containing the recombinant seHAS-~~■~~; 2, insoluble fraction after detergent solubilization of membranes; 3, detergent solubilized fraction; 4, flow-through from the ~~■~~-NTA chromatography resin; 5-9, five successive washes of the column (two column volumes each); 10, the eluted pure HA synthase which is a single band.

TABLE II

Step	Total Protein (ug)	Specific Activity (mmol/ug/hr.)	Total Activity (mmol P-GlcA)	Yield (%)	Purification (-fold)
Membranes	3690	1.0	369	100	1.0
Extract	2128	2.2	468	129	2.2
Affinity Column	39	13	507	14	13.1

It is proposed that transformation of host cells with DNA segments encoding HAS will provide convenient means for obtaining a HAS protein. It is also proposed that cDNA, genomic sequences, and combinations thereof, are suitable for eukaryotic expression, as the host cell will, of course, process the genomic transcripts to yield functional mRNA for translation into protein.

Another embodiment of the present invention is a method of preparing a protein composition comprising growing a recombinant host cell comprising a vector that encodes a protein which includes an amino acid sequence in accordance with SEQ ID NO:2 or functionally similar with conserved or semi-conserved amino acid

changes. The host cell will be grown under conditions permitting nucleic acid expression and protein production followed by recovery of the protein so produced. The production of HAS and ultimately HA, including the host cell, conditions permitting nucleic acid expression, protein production and recovery will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure of the seHAS gene, and the seHAS gene protein product HAS, and by the methods described herein.

Preferred hosts for the expression of hyaluronic acid are prokaryotes, such as *S. equisimilis*, and other suitable members of the *Streptococcus* species. However, it is also known that HA may be synthesized by heterologous host cells expressing recombinant HA synthase, such as species members of the *Bacillus*, *Enterococcus*, or even *Escherichia* genus. A most preferred host for expression of the HA synthase of the present invention is a bacteria transformed with the HAS gene of the present invention, such as *Lactococcus* species, *Bacillus subtilis* or *E. coli*.

It is similarly believed that almost any eukaryotic expression system may be utilized for the expression of HAS e.g., baculovirus-based, glutamine synthase-based, dihydrofolate reductase-based systems, SV-40 based, adenovirus-based, cytomegalovirus-based, yeast-based, and the like, could be employed. For expression in this manner, one would position the coding sequences adjacent to and under the control of the promoter. It is understood in the art that to bring a coding sequence under the control of such a promoter, one positions the 5' end of the transcription initiation site of the

transcriptional reading frame of the protein between about 1 and about 50 nucleotides "downstream" of (i.e., 3' of) the chosen promoter. Also, *Saccharomyces cerevisiae* yeast expression vector systems, such as pYES2, will also produce HAS under control of the GAL promoter as shown in FIG. 7. FIG. 7 shows that the sPHAS enzyme was produced in recombinant yeast using the pYES2 plasmid. When supplied with UDP-GlcA and UDP-GlcNAc, the enzyme makes high molecular weight HA.

Where eukaryotic expression is contemplated, one will also typically desire to incorporate into the transcriptional unit which includes the HAS gene or DNA, an appropriate polyadenylation site (e.g., 5'-AATAAA-3') if one was not contained within the original cloned segment. Typically, the polyA addition site is placed about 30 to 2000 nucleotides "downstream" of the termination site of the protein at a position prior to transcription termination.

It is contemplated that virtually any of the commonly employed host cells can be used in connection with the expression of HAS in accordance herewith. Examples of preferred cell lines for expressing HAS cDNA of the present invention include cell lines typically employed for eukaryotic expression such as 239, AtT-20, HepG2, VERO, HeLa, CHO, WI 38, BHK-COS-7, RIN and MDCK cell lines. This will generally include the steps of providing a recombinant host bearing the recombinant DNA segment encoding the HAS enzyme and capable of expressing the enzyme; culturing the recombinant host in media under conditions that will allow for transcription of the cloned HAS gene or cDNA and appropriate for the production of the

hyaluronic acid; and separating and purifying the HAS enzyme or the secreted hyaluronic acid from the recombinant host.

Generally, the conditions appropriate for expression of the cloned HAS gene or cDNA will depend upon the promoter, the vector, and the host system that is employed. For example, where one employs the lac promoter, one will desire to induce transcription through the inclusion of a material that will stimulate lac transcription, such as isopropylthiogalactoside. For example, the cloned seHAS gene of the present invention is expressed as a HIS<sub>3</sub> containing protein in *E. coli* as shown in FIG. 5. Where other promoters are employed, different materials may be needed to induce or otherwise up-regulate transcription.

FIG. 5 depicts the overexpression of recombinant seHAS and spHAS in *E. coli*. Membrane proteins (5mg per lane) were fractionated by SDS-PAGE using a 10% (w/v) gel under reducing conditions. The gel was stained with Coomassie blue R-250, photographed, scanned, and quantitated using a molecular dynamics personal densitometer (model PDSI P60). The position of HA synthase is marked by the arrow. Lane A is native spHAS (Group A); Lane C is native seHAS; Lane E is recombinant seHAS; Lane P is recombinant spHAS; Lane V is vector alone. Standards used were Bio-rad low Mr and shown in kDa.

In addition to obtaining expression of the synthase, one will preferably desire to provide an environment that is conducive to HA synthesis by including appropriate genes encoding enzymes needed for the biosynthesis of sugar nucleotide precursors, or by using growth



media containing substrates for the precursor-supplying enzymes, such as N-acetylglucosamine or glucosamine (GlcNAc or GlcNH<sub>2</sub>) and glucose (Glc).

One may further desire to incorporate the gene in a host which is defective in the enzyme hyaluronidase, so that the product synthesized by the enzyme will not be degraded in the medium. Furthermore, a host would be chosen to optimize production of HA. For example, a suitable host would be one that produced large quantities of the sugar nucleotide precursors to support the HAS enzyme and allow it to produce large quantities of HA. Such a host may be found naturally or may be made by a variety of techniques including mutagenesis or recombinant DNA technology. The genes for the sugar nucleotide synthesizing enzymes, particularly the UDP-Glc dehydrogenase required to produce UDP-GlcA, could also be isolated and incorporated in a vector along with the HAS gene or cDNA. A preferred embodiment of the present invention is a host containing these ancillary recombinant genes or cDNAs and the amplification of these gene products thereby allowing for increased production of HA.

The means employed for culturing of the host cell is not believed to be particularly crucial. For useful details, one may wish to refer to the disclosure of U.S. Pat. Nos. 4,517,295; 4,801,539; 4,784,990; or 4,780,411; all incorporated herein by reference. Where a prokaryotic host is employed, such as *S. equisimilis*, one may desire to employ a fermentation of the bacteria under anaerobic conditions in CO<sub>2</sub>-enriched broth growth media. This allows for a greater production of HA than under aerobic conditions.

Another consideration is that Streptococcal cells grown anaerobically do not produce pyrogenic exotoxins. Appropriate growth conditions can be customized for other prokaryotic hosts, as will be known to those of skill in the art, in light of the present disclosure.

Once the appropriate host has been constructed, and cultured under conditions appropriate for the production of HA, one will desire to separate the HA so produced. Typically, the HA will be secreted or otherwise shed by the recombinant organism into the surrounding media, allowing the ready isolation of HA from the media by known techniques. For example, HA can be separated from the cells and debris by filtering and in combination with separation from the media by precipitation by alcohols such as ethanol. Other precipitation agents include organic solvents such as acetone or quaternary organic ammonium salts such as cetyl pyridinium chloride (CPC).

A preferred technique for isolation of HA is described in U.S. Pat. No. 4,517,295, and which is incorporated herein by reference, in which the organic carboxylic acid, trichloroacetic acid, is added to the bacterial suspension at the end of the fermentation. The trichloroacetic acid causes the bacterial cells to clump and die and facilitates the ease of separating these cells and associated debris from HA, the desired product. The clarified supernatant is concentrated and dialyzed to remove low molecular weight contaminants including the organic acid. The aforementioned procedure utilizes filtration through filter cassettes containing

0.22  $\mu$ m pore size filters. Diafiltration is continued until the conductivity of the solution decreases to approximately 0.5 megaohms.

The concentrated HA is precipitated by adding an excess of reagent grade ethanol or other organic solvent and the precipitated HA is then dried by washing with ethanol and vacuum dried, lyophilized to remove alcohol. The HA can then be redissolved in a borate buffer, pH 8, and precipitated with CPC or certain other organic ammonium salts such as CEB, a mixed trimethyl ammonium bromide solution at 4 degree(s) Celsius. The precipitated HA is recovered by coarse filtration, resuspended in 1 M NaCl, diafiltered and concentrated as further described in the above referenced patent. The resultant HA is filter sterilized and ready to be converted to an appropriate salt, dry powder or sterile solution, depending on the desired end use.

#### A. Typical Genetic Engineering Methods Which May Be Employed

If cells without formidable cell membrane barriers are used as host cells, transfection is carried out by the calcium phosphate precipitation method, well known to those of skill in the art. However, other methods may also be used for introducing DNA into cells such as by nuclear injection, cationic lipids, electroporation, protoplast fusion or by the Biolistic(tm) Bioparticle delivery system developed by DuPont (1989). The advantage of using the DuPont system is a high transformation efficiency. If prokaryotic cells or cells which contain substantial cell wall constructions are used, the preferred method of

transfection is calcium treatment using calcium chloride to induce competence or electroporation.

Construction of suitable vectors containing the desired coding and control sequences employ standard ligation techniques. Isolated  
5 plasmids or DNA fragments are cleaved, tailored, and religated in the form desired to construct the plasmids required. Cleavage is performed by treating with restriction enzyme (or enzymes) in suitable buffer. In general, about 1  $\mu$ g plasmid or DNA fragments are used with about 1 unit of enzyme in about 20  $\mu$ l of buffer  
10 solution. Appropriate buffers and substrate amounts for particular restriction enzymes are specified by the manufacturer. Incubation times of about 1 hour at 37° C are workable.

After incubations, protein is removed by extraction with phenol and chloroform, and the nucleic acid is recovered from the aqueous  
15 fraction by precipitation with ethanol. If blunt ends are required, the preparation is treated for 15 minutes at 15° C with 10 units of Polymerase I (Klenow), phenol-chloroform extracted, and ethanol precipitated. For ligation approximately equimolar amounts of the desired components, suitably end tailored to provide correct  
20 matching are treated with about 10 units T4 DNA ligase per 0.5  $\mu$ g DNA. When cleaved vectors are used as components, it may be useful to prevent religation of the cleaved vector by pretreatment with bacterial alkaline phosphatase.

For analysis to confirm functional sequences in plasmids  
25 constructed, the first step was to amplify the plasmid DNA by cloning into specifically competent *E. coli* SURE cells (Stratagene)

by doing transformation at 30-32°C. Second, the recombinant plasmid is used to transform *E. coli* K5 strain B18337-41, which can produce the UDP-GlcA precursor, and successful transformants selected by antibiotic resistance as appropriate. Plasmids from the library of transformants are then screened for bacterial colonies that exhibit HA production. These colonies are picked, amplified and the plasmids purified and analyzed by restriction mapping. The plasmids showing indications of a functional HAS gene are then further characterized by any number of sequence analysis techniques which are known by those of ordinary skill in the art.

#### B. Source and Host Cell Cultures and Vectors

In general, prokaryotes were used for the initial cloning of DNA sequences and construction of the vectors useful in the invention. It is believed that suitable source may be Gram-positive cells, particularly those derived from the Group C *Streptococcal* strains. Bacteria with a single membrane, but a thick cell wall such as *Staphylococci* and *Streptococci* are Gram-positive. Gram-negative bacteria such as *E. coli* contain two discrete membranes rather than one surrounding the cell. Gram-negative organisms tend to have thinner cell walls. The single membrane of the Gram-positive organisms is analogous to the inner plasma membrane of Gram-negative bacteria. The preferred host cells are *Streptococcus* strains that are adapted to become hyaluronidase negative or otherwise inhibited (EP144019, EP266578, EP244757). *Streptococcus* strains that have been particularly useful include *S. equisimilis* and *S. zooepidemicus*.

Prokaryotes may also be used for expression. For the expression of HA synthase in a form most likely to accommodate high molecular weight HA synthesis, one may desire to employ *Streptococcus* species such as *S. equisimilis* or *S. zooepidemicus*.

5 The aforementioned strains, as well as *E. coli* W3110 (F-, lambda-, prototrophic, ATCC No. 273325), bacilli such as *Bacillus subtilis*, or other enterobacteriaceae such as *Serratia marcescens*, could be utilized to generate a "super" HAS containing host.

10 In general, plasmid vectors containing origins of replication and control sequences which are derived from species compatible with the host cell are used in connection with these hosts. The vector ordinarily carries an origin of replication, as well as marking sequences which are capable of providing phenotypic selection in transformed cells. For example, *E. coli* is typically transformed  
15 using pBR322, a plasmid derived from an *E. coli* species. pBR322 contains genes for ampicillin and tetracycline resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells. A pBR plasmid or a pUC plasmid, or other microbial plasmid or phage must also contain, or be modified to contain, promoters which can be used  
20 by the microbial organism for expression of its own proteins.

Those promoters most commonly used in recombinant DNA construction include the *lacZ* promoter, *tac* promoter, the T7 bacteriophage promoter, and tryptophan (*trp*) promoter system. While these are the most commonly used, other microbial promoters have  
25 been discovered and utilized, and details concerning their nucleotide sequences have been published, enabling a skilled worker

to ligate them functionally with plasmid vectors. Also for use with the present invention one may utilize integration vectors.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes, such as yeast cultures may also be used. *Saccharomyces cerevisiae*, or common  
5 baker's yeast is the most commonly used among eukaryotic microorganisms, although a number of other strains are commonly available. For expression in *Saccharomyces*, the plasmid YRp7, for example, is commonly used. This plasmid already contains the *trp1* gene which provides a selection marker for a mutant strain of yeast  
10 lacking the ability to grow without tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1. The presence of the *trp1* lesion as a characteristic of the yeast host-cell genome then provides an effective environment for detecting transformation by growth in the absence of tryptophan. Suitable promoting sequences in yeast  
15 vectors include the promoters for the galactose utilization genes, the 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase,  
20 triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

In constructing suitable expression plasmids, the termination sequences associated with these genes are also ligated into the expression vector 3' of the sequence desired to be expressed to  
25 provide polyadenylation of the mRNA and termination. Other promoters, which have the additional advantage of transcription

==

controlled by growth conditions are the promoter region for alcohol dehydrogenase 2, cytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, and the aforementioned glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible  
5 for maltose and galactose utilization. Any plasmid vector containing a yeast-compatible promoter, origin of replication and termination sequences is suitable.

In addition to microorganisms, cultures of cells derived from multicellular organisms may also be used as hosts. In principle,  
10 any such cell culture is workable, whether from vertebrate or invertebrate culture. However, interest has been greatest in vertebrate cells, and propagation of vertebrate cells in culture has become a routine procedure in recent years. Examples of such useful host cell lines are VERO and HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO)  
15 cell lines, and WI38, BHK, COS, and MDCK cell lines.

For use in mammalian cells, the control functions on the expression vectors are often provided by viral material. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus 2, bovine papilloma virus and most frequently Simian  
20 Virus 40 (SV40). The early and late promoters of SV40 virus are particularly useful because both are obtained easily from the virus as a fragment which also contains the SV40 viral origin of replication. Smaller or larger SV40 fragments may also be used, provided there is included the approximately 250 bp sequence  
25 extending from the *Hind* III site toward the *Bgl* I site located in the viral origin of replication.



Further, it is also possible, and often desirable, to utilize promoter or control sequences normally associated with the desired gene sequence, provided such control sequences are compatible with the host cell systems. An origin of replication may be provided either by construction of the vector to include an exogenous origin, such as may be derived from SV40 or other viral (e.g., Polyoma, Adeno, BPV) source, or may be provided by the host cell chromosomal replication mechanism. If the vector is integrated into the host cell chromosome, the latter mechanism is often sufficient.

C. Isolation of a bona fide *seHAS* gene from a highly encapsulated strain of Group *Streptococcus equisimilis*.

The encoded protein, designated *seHAS*, is 417 amino acids (calculated molecular weight of 4778 and pI of 9.1) and is the smallest member of the HAS family identified thus far (FIG. 2). *seHAS* also migrates anomalously fast in SDS-PAGE ( $M_r$  ~42 kDa) (FIGS. 5 and 8).

FIG. 8 is a graphical representation of a Western Blot analysis of recombinant *seHAS* using specific antibodies. Group C (C; lane 1) or Group A (A; lane 4) *Streptococcus* membranes and *E. coli* membranes (9 mg/lane) containing recombinant *seHAS* (E; lanes 2, 7, and 9) or *spHAS* (P; lanes 3, 6, 8, and 10) were fractionated by reducing SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose. Strips of nitrocellulose were probed and developed as described in the application using purified IgG fractions raised to the following regions of *spHAS*: central domain peptide E<sup>147</sup>-T<sup>161</sup> (lanes 1-4); C-terminus peptide (lanes 5-6); the complete protein (lanes 7 and 8);

recombinant central domain (lanes 9 and 10). Nonimmune IgG or membranes from cells transformed with vector alone gave no staining as in lane 5.

The seHAS and spHAS protein (previously identified in U.S. Serial No. 08/899,940) encoding sequences are 72% identical. The deduced protein sequence of seHAS was confirmed by reactivity with a synthetic peptide antibody (FIG. 8). Recombinant seHAS expressed in *E. coli* was recovered in membranes as a major protein (FIG. 5) and synthesized very large molecular weight HA in the presence of UDP-GlcNAc and UDP-GlcA in vitro (FIG. 9).

FIG. 9 shows a kinetic analysis of the HA size distributions produced by seHAS and spHAS. *E. coli* membranes containing equal amounts of seHAS or spHAS protein were incubated at 37°C with 1.35 mM UDP-<sup>14</sup>C GlcA ( $1.3 \times 10^3$  dpm/nmol) and 3.0 mM UDP-GlcNAc as described in the application. These substrate concentrations are greater than 15 times the respective  $K_m$  values. Samples taken at 0.5, 1.0, and 60 min were treated with SDS and chromatographed over Sephacryl S400 HR. The HA profiles in the fractionation range of the column (fractions 12-24) are normalized to the percent of total HA in each fraction. The values above the arrows in the top panel are the MWS (in millions) of HA determined directly in a separate experiment using a Dawn multiangle laser light scattering instrument (Wyatt Technology Corp.). The size distributions of HA synthesized by seHAS (●, ■, ▲) and spHAS (○, □, ▬) at 0.5 min (○, ●), 1.0 min (□, ■) and 60 min (▬, ▲) are shown as indicated. Analysis showed that seHAS and spHAS are essentially identical in the size distribution of HA

chains they synthesize (FIG. 9). *Se*AS is twice as fast as *sp*HAS in its ability to make HA.

### C.1 Bacterial strains and vectors

The mucoid group C strain D181; *Streptococcus equisimilis*) was  
5 obtained from the Rockefeller University Collection. The *E. coli*  
host strains Sure and XL1-Blue MRF' were from Stratagene and strain  
Top10 F' was from Invitrogen. Unless otherwise noted, *Streptococci*  
were grown in THY and *E. coli* strains were grown in LB medium. pKK-  
223 Expression vector was from Pharmacia, PCR 2.1 cloning vector was  
10 from Invitrogen, and predigested  $\lambda$  *Zip* Express TM Bam HI/CIAF Vector  
was from Stratagene.

### C.2 Recombinant DNA and Cloning

High molecular mass Genomic DNA from *Streptococcus equisimilis*  
isolated by the method of Caparon and Scott (as known by those with  
15 ordinary skill in the art) was partially digested with *Sau*3A1 to an  
average size of 2-12 kb. The digested DNA was precipitated with  
ethanol, washed and ligated to the Bam HI/CIAF *Zip* Express vector.  
Ligated DNA was packaged into phage with a Packagene™ extract  
obtained from Promega. The titer of the packaged phage library was  
20 checked using XL1-Blue MRF' *E. coli* as a host.

### C.3 Degenerate PCR Amplification

Degenerate oligonucleotides were designed based upon conserved  
sequences among *sp*HAS (*Streptococcus pyogenes*), DG42 (*Xenopus laevis*  
HAS; 19) and *nodC* (a *Rhizobium meliloti* nodulation factor; 20) and  
25 were used for PCR amplification with D181 genomic DNA as a template.  
Amplification conditions were 34 cycles at: 94°C for 1 min, 44°C for

1 min, 72°C for 1.5 min followed by a final extension at 72°C for 10 min. Oligonucleotide *HADRF1*, 5'-GAY MGA YRT YTX ACX AAT TAY GCT ATH GAY TTR GG-3' (SEQ ID NO:20; sense strand) corresponds to the sequence D<sup>259</sup>RCLTNYAIDL (SEQ ID NO:9; *sphas*). Oligonucleotide *HACTR1*, 5'-ACG WGT WCC CCA NTC XGY ATT TTT NAD XGT RCA-3' (SEQ ID NO:21; antisense strand) corresponds to the region C<sup>404</sup>TIKNTWGTTR (SEQ ID NO:10; *sphas*). The degeneracy of bases at some positions are represented by nomenclature adopted by the IUPAC in its codes for degenerate bases listed in Table IV.

TABLE IV  
IUPAC Codes - Degenerate Bases

The International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) has established a standard single-letter designation for degenerate bases. These are:

B	=	C+G+T
D	=	A+G+T
H	=	A+C+T
K	=	T+G
M	=	A+C
N	=	A+C+G+T
R	=	A+G
S	=	G+C
W	=	A+T
V	=	A+C+G
X	=	a minor bases (specified elsewhere)
Y	=	C+T

These two oligonucleotides gave a 459 bp PCR product, which was separated on an agarose gel and purified using the BIO-101 Geneclean kit. This fragment was then cloned into PCR2.1 vector using TOP 10 F' cells as a host according to the manufacturer's directions. Double stranded plasmid DNA was purified from *E. coli* (Top 10 F') using the QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen). Two other degenerate

sense primers were also synthesized: HAVAF1, 5'-GTN GCT GCT GTW RTX CCW WSX TWT AAY GAR GA-3' (SEQ ID NO:22, corresponding to the region V<sup>66</sup>AAVIPSUNE (SEQ ID NO: ) of spHAS) and HAVDF1, 5'-GTX RWT GAY GGN WSX WSN RAX GAT G GC-3' (SEQ ID NO:23, based on V<sup>100</sup>DDGSSNTD (SEQ ID NO:12) of spHAS). Two unique antisense primers were synthesized based on the sequence of the 459 bp PCR product. These were: D181.2, 5'-GGA CTT GTT CCA GCG GT-3' (SEQ ID NO:13) and D181.4, 5'-TGA TTC CGA CAC AGG GC-3' (SEQ ID NO:14). Each of the two degenerate sense primers, when used with either D181.2 or D181.4 to amplify D181 genomic DNA, gave expected size PCR products. The four PCR products were cloned and sequenced using the same strategy as above. For each PCR product, sequences obtained from six different clones were compared in order to derive a consensus sequence. Thus we obtained a 1042 bp sequence with a continuous ORF with high homology to spHAS.

#### C.4 Library Screening

Two molecular probes were used to screen the library; the cloned 459 bp PCR product and oligonucleotide D181.5 (5'-GCTTGATAGGTCACCAAGTGTACG-3' (SEQ ID NO:15); derived from the 1042 bp sequence). The 459 bp PCR product was radiolabeled using the Prime-It II random primer labeling Kit (Stratagene) according to the manufacturers instructions. Oligonucleotides were labeled by Kinase-It Kinase Labeling Kit (Stratagene) using [<sup>32</sup>P]ATP. Radiolabeled products were separated from nonlabeled material on NucTrap Push columns (Stratagene). The oligoprobe hybridized specifically with a D181 genomic digest on Southern blots. To screen the λ phage library, XLBLUE MRF<sup>+</sup> was used as a host (3000 plaques/plate) on

Nitrocellulose membranes containing adsorbed phage, were prehybridized at 60°C and hybridized with 5'-end labeled oligonucleotide, D181.5, in QuikHyb Hybridization solution (Stratagene) at 80°C according to instructions.

The membranes were then washed with 2x SSC buffer and 0.1% (w/v) SDS at room temperature for 15 min, at 60°C with 0.1x SSC buffer and 0.1% SDS (w/v) for 30 min, dried and then exposed to Bio-Max MS film overnight at -70°C. Positive plaques were replated and rescreened twice. Pure positive phages were saved in SM buffer with chloroform. PCR on these phages with vector primers revealed 3 different insert sizes.

PCR with a combination of vector primers and primers from different regions of the cloned 1042 bp sequence revealed that only one of the three different phages had the complete HAS gene. The insert size in this phage was 6.5 kb. Attempts to subclone the insert into plasmid form by autoexcision from the selected phage library clone failed. Therefore, a PCR strategy was applied again on the pure positive phage DNA to obtain the 5' and 3' end of the ORF. Oligonucleotide primers D181.3 (5'-GCCCTGTGTCGGAACATTCA-3' (SEQ ID NO:16)) and T3 (vector primer) amplified a 3kb product and oligonucleotides D181.5 and T7 (vector primer) amplified a 2.5 kb product. The 5' and 3'-end sequences of the ORF were obtained by sequencing these two above products. Analysis of all PCR product sequences allowed us to reconstruct the ORF of the 1254 bp seHAS gene.

### C.5 Expression cloning of the seHAS

Primers were designed at the start and stop codon regions of seHAS to contain an *Eco*R1 restriction site in the sense oligonucleotide (5'-AGGATCCGAATTC=GAGAACATTAAAAACCTC-3' (SEQ ID NO:17)) and a *Pst*I site in the antisense oligonucleotide (5'-AGAATTCTGCAGTTATAATAATTTTTTACGTGT ' (SEQ ID NO:18)). These primers amplified a 1.2 kb PCR product from D181 genomic DNA as well as from pure hybridization-positive phage. The 1.2 kb product was purified by agarose gel electrophoresis, digested with *Pst*I and *Eco*R1 and cloned directionally into *Pst*I- and *Eco*R1-digested pKK223 vector. The ligated vector was transformed into *E. coli* SURE cells that were then grown at 30°C. This step was practically important since other host cells or higher temperatures resulted in deletions of the cloned insert. Colonies were isolated and their pDNA purified. Out of six colonies (named a,b,c,d,e, and ), five had the correct size insert, while one had no insert.

### C.6 HA Synthase Activity

HA synthase activity was assayed in membranes prepared from the 5 above clones. Fresh log phase cells were harvested at 3000g, washed at 4°C with PBS and membranes were isolated by a modification of a protoplast method as known by those of ordinary skill in the art. Membrane preparations from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis* were also obtained by modification of a different protoplast procedure. Membranes were incubated at 37°C in 50 mM sodium and potassium phosphate, pH 7.0 with 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTE, 120 μM UDP-GlcA and 300 μM UDP-GlcNAc. Incorporation of sugar

was monitored by using UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA (318 mCi/mmol; ICN) and/or UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc (29.2 Ci/mmol NEN). Reactions were terminated by addition of SDS to a final concentration of 2% (w/v). Product HA was separated from precursors by descending paper chromatography and measured by determining incorporated radioactivity at the origin.

#### C.7 Gel Filtration Analysis

Radiolabeled HA produced in vitro by membranes containing recombinant seHAS or spHAS was analyzed by chromatography on a column (0.9 x 40 cm) of Sephacryl S500 HR (Pharmacia Biotech Inc.). Samples (0.4 ml in 200 mM NaCl, 5mM Tris-HCl, pH 8.0, plus 0.5% SDS) were eluted with 200 mM, NaCl, 5 mM Tris-HCL, and pH 8.0 and 0.5 ml fractions were assessed for <sup>14</sup>C and/or <sup>3</sup>H radioactivity. Authenticity of the HA polysaccharide was assessed by treatment of a separate identical sample with the HA-specific hyaluronate lyase of *Streptomyces hyalurolyticus* (EC 4.2.2.1) at 37°C for 3 hrs. The digest was then subjected to gel filtration.

#### C.8 SDS-PAGE and Western Blotting

SDS-PAGE was performed according to the Laemmli method. Electrotransfers to nitrocellulose were performed within standard blotting buffer with 20% methanol using a Bio-Rad mini Transblot device. The blots were blocked with 2% BSA in TBS. Protein A/G alkaline phosphatase conjugate (Pierce) and p-nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3 indolyl phosphate p-toluidine salt were used for detection.



### C.9 DNA Sequence and Analysis

Plasmids were sequenced on both strands using fluorescent labeled vector primers. Sequencing reactions were performed using a ThermoSequenase™ kit for fluorescent labeled primers (with 7-deazaG). Samples were electrophoresed on a Pharmacia ALF Express DNA Sequencer and data were analyzed by the ALF Manager Software v3.02. Internal regions of insert were sequenced with internal primers using the ABI Prism 377 (Software version 2.1.1). Ambiguous regions were sequenced manually using Sequenase™ 7-deaza - DNA polymerase, 7-deaza GTP master mix (USB) and [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP (Amersham Life Sciences). The sequences obtained were compiled and analyzed using DNASIS, v2.1 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.). The nucleotide and amino acid sequences were compared with other sequences in the Genbank and other databases.

### C.10 Identification of seHAS

Identification of seHAS was accomplished by utilizing a PCR approach with oligonucleotide primers based on several regions of high identity among spHAS, DG42 (known to be a developmentally regulated *X. laevis* HAS and designated xlHAS) and NodC (a *Rhizobium*  $\beta$ -GlcNAc transferase). The xlHAS and NodC proteins are, respectively, ~50% and ~10% identical to spHAS. This strategy yielded a 459 bp PCR product whose sequence was 66.4% identical to spHAS, indicating that a Group C homologue (seHAS) of the Group A (spHAS) HA synthase gene had been identified. The complete coding region of the gene was then reconstructed using a similar PCR-based strategy. A final set of PCR primers was then used to amplify the

complete ORF from genomic DNA. When this 1.2 kb PCR fragment was incorporated into the expression vector pKK223 and transformed into *E. coli* SURE cells, HA synthetic activity was demonstrated in isolated membranes from 5 of the 5 colonies tested.

5       The ORF of the reconstructed gene encodes a novel predicted protein of 417 amino acids that was not in the database and it is two amino acids shorter than sphAS. The two bacterial proteins are 72% identical and the nucleic acid sequences are 70% identical. The predicted molecular weight of the seHAS protein is 47,778 and the  
10       predicted isoelectric point is at pH 9.1. Three recently identified mammalian HASs (muHAS1, muHAS2, muHAS3, FIG. 2) are similar to the bacterial proteins. The overall identity between the two groups is ~28-31%, and in addition many amino acids in seHAS are highly conserved with those of the eukaryotic HASs (e.g. K/R or D/E  
15       substitutions). A98R, the PBCY-1 HAS is 28-33 percent identical to the mammalian HASs, and is predicted to have a similar topology in the lipid membrane. Within mammalian species the same family members are almost completely identical (e.g. muHAS1 and huHAS1 are 95% identical; muHAS2 and huHAS2 are 98% identical). However, and  
20       as shown in FIG. 3, even within the same species the different HAS family members are more divergent (e.g. muHAS1 and muHAS2 are 53% identical; muHAS1 and muHAS3 are 57% identical; muHAS2 and muHAS3 are 71% identical).

FIG. 10 shows hydropathy plots for seHAS and predicted membrane  
25       topology. The hydrophilicity plot for the Streptococcal Group C HAS was generated by the method of Kyte and Doolittle (J. Mol. Biol.

157, 105, 1982) using DNAsis. The protein is predicted to be an integral membrane protein.

FIG. 11 shows a model for the topologic organization of seHAS in the membrane. The proposed topology for the protein conforms to the charge-in rule and puts the large central domain inside. This domain is likely to contain most of the substrate binding and catalytic functions of the enzyme. Cys<sup>226</sup> in seHAS, which is conserved in all HAS family members as well as the other three cysteines are shown in the central domain. Cys<sup>281</sup> is a critical residue whose alteration can dramatically alter the size distribution of HA product synthesized by the enzyme.

The overall membrane topology predicted for seHAS is identical to that for spHAS and the eukaryotic HASs reported thus far. The protein has two putative transmembrane domains at the amino terminus and 2-3 membrane-associated or transmembrane domains at the carboxyl end. The hydropathy plots for the two Streptococcal enzymes are virtually identical and illustrate the difficulty in predicting the topology of the extremely hydrophobic region of ~90 residues at K<sup>313</sup>-R<sup>406</sup> in seHAS (K<sup>313</sup>-K<sup>405</sup> in spHAS).

seHAS was efficiently expressed in *E. coli* cells. Roughly 10% of the total membrane protein was seHAS as assessed by staining of SDS-PAGE gels (FIG. 5). The prominent seHAS band at 42 kD is quantitatively missing in the vector-only control lane. This unusually high level of expression for a membrane protein is also found for spHAS, using the same vector in SURE cells. About 8% of the membrane protein is spHAS in *E. coli* SURE cells. In contrast,

the amount of seHAS in Group C membranes is not more than 1% of the total membrane protein. The spHAS in Group A membranes is barely detectable. The recombinant seHAS expressed in *E. coli* SURE cells does not synthesize HA *in vivo*, since these cells lack UDP-GlcA, one of the required substrates. Membranes, however containing the recombinant seHAS protein synthesize HA when provided with the substrates UDP-GlcNAc and UDP-GlcA (FIG. 12).

FIG. 12 shows the synthesis of authentic HA by recombinant seHAS. *E. coli* membranes (69  $\mu$ g) prepared from cells containing recombinant seHAS or vector alone were incubated at 37°C for 1 hour with 700  $\mu$ M UDP- $^3$ H]GlcNAc ( $2.78 \times 10^3$  dpm/nmol;  $\square, \blacksquare$ ) and 300  $\mu$ M UDP- $^{14}$ C]GlcA ( $3.83 \times 10^3$  dpm/nmol;  $O, \bullet$ ) in a final volume of 200  $\mu$ l as described herein. The enzyme reaction was stopped by addition of EDTA to a final concentration of 25 mM. Half the reaction mix was treated with *Streptomyces* hyaluronidase at 37°C for 3 hours. SDS (2%, w/v) was added to hyaluronidase-treated ( $O, \square$ ) and untreated ( $\bullet, \blacksquare$ ) samples, which were heated at 90°C for 1 min. The samples were diluted to 500  $\mu$ l with column buffer (5 mM Tris, 0.2 M NaCl, pH 8.0), clarified by centrifugation and 200  $\mu$ l was injected onto a Sephacryl S-500 HR column. Fractions (1 ml) were collected and radioactivity was determined. ED is the peak elution position of blue dextran ( $\sim 2 \times 10^6$  DA; Pharmacia).  $V_0$  marks the excluded volume and  $V_i$  the included volume. The ratio of  $^{14}$ C]GlcA:  $^3$ H]GlcNAc incorporated into the total amount of HA fractionated on the column is 1.4, which is identical to the ratio of specific activities of the two substrates. Therefore, the molar ratios of

the sugars incorporated into product is 1:1 as predicted for authentic HA. Membranes from cells transformed with vector alone did not synthesize HA.

Using 120  $\mu$ M UDP-GlcA and 300  $\mu$ M UDP-GlcNAc, HA synthesis was linear with membrane protein (at  $\leq 0.1 \mu$ g) and for at least 1 hour. Also, membranes prepared from non-transformed cells or cells transformed with vector alone have no detectable HAS activity. HA synthesis is negligible if  $Mg^{+2}$  is chelated with EDTA (<5% of control) or if either of the two substrates are omitted (~2% of control). Recombinant seHAS also showed the expected specificity for sugar nucleotide substrates, being unable to copolymerize either UDP-GalA, UDP-Glc or UDP-GalNAc with either of the two normal substrates (Table II).

Based on gel filtration analysis, the average mass of the HA synthesized by seHAS in isolated membranes is  $5-10 \times 10^6$  Da. The product of the recombinant seHAS is judged to be authentic HA based on the equimolar incorporation of both sugars and its sensitivity to degradation by the specific *Streptomyces* hyaluronidase (FIG. 12). Although the conditions for total HA synthesis were not optimal (since ~90% of one substrate was incorporated into product), the enzyme produced a broad distribution of HA chain lengths. The peak fraction corresponds to an HA mass of  $7.5 \times 10^6$  Da which is a polymer containing approximately 36,000 monomeric sugars. The distribution of HA sizes resolved on this column ranged from  $2-20 \times 10^6$  Da.

The deduced protein sequence of seHAS was confirmed by the ability of antibodies to the spHAS protein to cross-react with the

Group C protein (FIG. 8). Polyclonal antibodies to the whole spHAS protein or to just the central domain of spHAS also reacted with the seHAS protein. Antipeptide antibody to the C-terminus of spHAS did not cross-react with this somewhat divergent region in the seHAS protein. However, antipeptide antibody directed against the spHAS sequence E<sup>147</sup>-T<sup>161</sup> recognized the same predicted sequence in seHAS. The antipeptide antibody also reacts with the native seHAS and spHAS proteins in Streptococcal membranes and confirms that the native and recombinant enzymes from both species are of identical size. Like the spHAS protein, seHAS migrates anomalously fast on SDS-PAGE. Although the calculated mass is 47,778 Da, the M<sub>r</sub> by SDS-PAGE is consistently ~42 kDa.

Because of the sequence identity within their central domain regions and the overall identical structure predicted for the two bacterial enzymes, the peptide-specific antibody against the region E<sup>147</sup>-T<sup>161</sup> can be used to normalize for HAS protein expression in membranes prepared from cells transformed with genes for the two different enzymes. Using this approach, membranes with essentially identical amounts of recombinant spHAS or seHAS were compared with respect to the initial rate of HA synthesis and the distribution of HA product size.

As shown for spHAS, the synthesis of HA chains by seHAS is processive. The enzymes appear to stay associated with a growing HA chain until it is released as a final product. Therefore, it is possible to compare the rates of HA elongation by seHAS and spHAS by monitoring the size distribution of HA chains produced at early

times, during the first round of H<sub>2</sub> chain synthesis. Based on gel filtration analysis of HA product sizes at various times, we estimated that the average rate of elongation by seHAS is about 9,000 monosaccharides/minute at 37°C (Fig. 9). In five minutes, the enzymes can polymerize an HA chain of 5-10x10<sup>6</sup> Da. During a 60 min incubation, therefore, each enzyme molecule could potentially initiate, complete and release on the order of 5-8 such large HA molecules. At early times (e.g. < 5 min), reflecting elongation of the first HA chains, the size distribution of HA produced by seHAS was shifted to larger species compared to spHAS. By 60 min the two distributions of HA product sizes are indistinguishable.

The cloned seHAS represents the authentic Group C HA synthase. Previously reported or disclosed "Group C" proteins are, therefore, not the true Group C HAS. The seHAS protein is homologous to nine of the currently known HA synthases from bacteria, vertebrates, and a virus that now comprise this rapidly growing HA synthase family. This homology is shown particularly in FIG. 2. In mammals three genes, designated HAS 1, HAS 2 and HAS 3, have been identified and mapped to three different chromosomes in both human and mouse. In amphibians the only HAS protein identified thus far is the developmentally regulated DG42, which was cloned in 1988 and recently shown to encode the HA synthase activity by analysis of the recombinant protein in yeast membranes. Probably other *X. laevis* HAS genes will soon be identified.

A divergent evolution model suggests that a primitive bacterial HAS precursor may have been co-opted early during vertebrate

8

development or the bacterial pathogenic strategy of making an HA capsule was developed when a primitive bacteria captured in primordial HAS. Convergent evolution of the bacterial and eukaryotic HAS enzymes to a common structural solution seems unlikely, but may have occurred.

None of the three mammalian isozymes for HAS have yet been characterized enzymatically with respect to their HA product size. At least ten identified HAS proteins are predicted to be membrane proteins with a similar topology. HA synthesis occurs at the plasma membrane and the HA is either shed into the medium or remains cell associated to form the bacterial capsule or a eukaryotic pericellular coat. The sugar nucleotide substrates in the cytoplasm are utilized to assemble HA chains that are extruded through the membrane to the external space.

The protein topology in the very hydrophobic carboxyl portion of the HAS protein appears to be critical in understanding how the enzymes extend the growing HA chain as it is simultaneously extruded through the membrane. For example, the unprecedented enzymatic activity may require unusual and complex interactions of the protein with the lipid bilayer. Preliminary results based on analysis of spHAS-alkaline phosphatase fusion proteins indicate that the amino and carboxyl termini and the large central domains are all intracellular, as shown in FIGS. 10 and 11. The seHAS protein also contains a large central domain (~63% of the total protein) that appears to contain the two substrate binding sites and the two glycosyltransferase activities needed for HA synthesis. Although



current software programs cannot reliably predict the number or nature of membrane-associated domains within the long C-terminal hydrophobic stretch, the proposed topological arrangement agrees with the present evidence and applies as well to the eukaryotic enzymes, which are ~40% larger primarily due to extension of the C-terminal end of the protein with 2 additional predicted transmembrane domains.

Four of the six Cys residues in spHAS are conserved with seHAS. Only Cys225 in both bacterial enzymes is conserved in all members of the HAS family. Since sulphydryl reactive agents, such as p-mercurobenzoate or NEM, greatly inhibit HAS activity, it is likely that this conserved Cys is necessary or important for enzyme activity. Initial results from site-directed mutagenesis studies, however, indicate that a C225S mutant of spHAS is not inactive, it retains 5-10% of wildtype activity.

The recognition of nucleic acid sequences encoding only seHAS, only spHAS, or both seHAS and spHAS using specific oligonucleotides is shown in FIG. 13. These pairs of sense-antisense oligonucleotides were designed based on the sequence of ID SEQ NO. 1 and the coding sequence for spHAS. The seHAS based nucleic acid segments (se1-se2 and seSP1-seSP2) are indicated in FIG. 14. These three oligonucleotide pairs were hybridized under typical PCR reactions with genomic DNA from either Group C (seHAS) (lanes 2, 4, and 6) or Group A (spHAS) (lanes 3, 5, and 7) streptococci. Lanes 1 and 8 indicate the positions of MW standards in kb (kilobases). The PCR reactions were performed using Taq DNA polymerase (from Promega)

for 25 cycles as follows: 94 degrees Celsius for 1 minute to achieve DNA denaturation, 48 degrees Celsius (42 degrees Celsius for the smaller common sesp primers) for 1 minute to allow hybridization, and 72 degrees Celsius for 1.5 minutes for DNA synthesis. The PCR reaction mixtures were then separated by electrophoresis on a 1% agarose gel.

The se1-se2 primer pair was designed to be uniquely specific for the Group C HAS (seHAS). The sp1-sp2 primer pair was designed to be uniquely specific for the Group A HAS (spHAS). The sesp1-sesp2 primer pair was designed to hybridize to both the Group A and Group C HAS nucleic acid sequences. All three primer pairs behaved as expected, showing the appropriate ability to cross-hybridize and support the generation of PCR products that were specific and/or unique.

The oligonucleotides used for specific PCR or hybridization are shown in FIG. 14. The synthetic oligonucleotides of SEQ ID NOS: 3, 4, 5, and 6 are indicated in the corresponding regions of SEQ ID NO. 1. These regions are in bold face and marked, respectively as primers se1, se2, sesp1, and sesp2. The #1 indicates primers in the sense direction, while the #2 indicates a primer in the antisense direction. Each of the four oligonucleotides will hybridize specifically with the seHAS sequence and the appropriate pairs of sense/antisense primers are suitable for use in the polymerase chain reaction as shown in FIG. 13.

FIG. 7 shows a gel filtration analysis of hyaluronic acid synthesized by recombinant HAS expressed in yeast membranes. A DNA

fragment encoding the open reading frame of 419 amino acid residues corresponding to spHAS (with the original Val codon switched to Met) was subcloned by standard methods in the pYES2 yeast expression vector (from Invitrogen) to produce pYES/HA. Membranes from cells with this construct were prepared by agitation with glass beads. The samples derived from pYES/HA constructs contained substantial HA synthase activity and the "42 kDa" HAS protein was detected by Western analysis using specific antibodies; membranes from cells with vector alone possessed neither activity nor the immunoreactive band (not shown). Membranes (315 µg protein) were first incubated with carrier free UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA (1 Ci/<sup>14</sup>C) and 900 µM unlabeled UDP-GlcNAc in 50 mM Tris, pH 7, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, and 0.05 M NaCl (450 µl reaction volume) at 30 degrees Celsius for 1.5 minutes. After this pulse-label period non-radiolabeled UDP-GlcA was then added to final concentrations of 900 µM. Samples (100 µL) were taken after the pulse at 1.5 min (dark circle), and 15 (black square), and 45 (black triangle) min after the "chase." The reactions were terminated by the addition of SDS to 2% and heating at 95 degrees Celsius for 1 min. The samples were clarified by centrifugation (10,000 x g, 5 min) before injection of half of the sample onto a Sephacryl S-500HR gel filtration column (Pharmacia; 1 x 50 cm) equilibrated in 0.2 M NaCl, 5 mM Tris, pH 8.

The column was eluted at 0.5 ml/min and radioactivity in the fractions (1 ml) was quantitated by liquid scintillation counting after adding BioSafeII cocktail (0.5 ml, Research Products Intl.). The void volume and the total included volumes were at elution

volumes of 14 ml and 35.5 ml, respectively. The peak of blue dextran (average  $2 \times 10^6$  Da) eluted at 25-27 ml. The recombinant HAS expressed in the eukaryotic yeast cells makes high molecular weight hyaluronic acid *in vitro*.

5        Thus it should be apparent that there has been provided in accordance with the present invention a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active HAS, methods of producing hyaluronic acid from the seHAS gene, and the use of hyaluronic acid produced from a HAS encoded by the seHAS  
10        gene, that fully satisfies the objectives and advantages set forth above. Although the invention has been described in conjunction with specific embodiments thereof, it is evident that many alternatives, modifications, and variations will be apparent to those skilled in the art. Accordingly, it is intended to embrace  
15        all such alternatives, modifications, and variations that fall within the spirit and broad scope of the appended claims.

Claims

What we claim is:

1. A purified nucleic acid segment comprising a coding region encoding enzymatically active hyaluronate synthase.
2. The purified nucleic acid segment of claim 1, wherein the purified nucleic acid segment encodes the *Streptococcus equisimilis* hyaluronate synthase of SEQ ID NO:2.
3. The purified nucleic acid segment of claim 1, wherein the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1.
4. A purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active hyaluronate synthase, wherein the purified nucleic acid segment is capable of hybridizing to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1.
5. A purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active hyaluronate synthase, wherein the purified nucleic acid segment has semi-conservative or conservative amino acid changes when compared to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1.
6. A recombinant vector selected from the group consisting of a plasmid, cosmid, phage, or virus vector and wherein the

recombinant vector further comprises a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active hyaluronan synthase.

7. The recombinant vector of claim 5, wherein the purified nucleic acid segment encodes the *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase of SEQ ID NO:2.

8. The recombinant vector of claim 6, wherein the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1.

9. The recombinant vector of claim 6, wherein the plasmid further comprises an expression vector.

10. The recombinant vector of claim 9, wherein the expression vector comprises a promoter operatively linked to the enzymatically active *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase coding region.

11. A recombinant host cell, wherein the recombinant host cell is a prokaryotic cell transformed with a recombinant vector comprising a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active hyaluronan synthase.

12. The recombinant host cell of claim 11, wherein the purified nucleic acid segment encodes the *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase of SEQ ID NO:2 —

13. The recombinant host cell of claim 11, wherein the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1.

14. The recombinant host cell of claim 13, wherein the host cell produces hyaluronic acid.

15. The recombinant host cell of claim 11, wherein the enzymatically active hyaluronan synthase is capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified structure.

16. The recombinant host cell of claim 11, wherein the enzymatically active hyaluronan synthase is capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified size distribution.

17. A recombinant host cell, wherein the recombinant host cell is a eukaryotic cell transfected with a recombinant vector comprising a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active hyaluronan synthase.

18. The recombinant host cell of claim 17, wherein the purified nucleic acid segment encodes the *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase of SEQ ID NO:2.

19. The recombinant host cell of claim 17, wherein the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1.

20. The recombinant host cell of claim 19, wherein the host cell produces hyaluronic acid.

21. The recombinant host cell of claim 17, wherein the enzymatically active hyaluronan synthase is capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified structure.

22. The recombinant host cell of claim 17, wherein the enzymatically active hyaluronan synthase is capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified size distribution.

23. A recombinant host cell, wherein the recombinant host cell is electroporated to introduce a recombinant vector into the recombinant host cell, wherein the recombinant vector comprises a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active hyaluronan synthase.



24. The recombinant host cell of claim 23, wherein the purified nucleic acid segment encodes the *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase of SEQ ID NO:2.

25. The recombinant host cell of claim 23, wherein the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1.

26. The recombinant host cell of claim 25, wherein the host cell produces hyaluronic acid.

27. The recombinant host cell of claim 23, wherein the enzymatically active hyaluronan synthase is capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified structure.

28. The recombinant host cell of claim 23, wherein the enzymatically active *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase is capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified size distribution.

29. A recombinant host cell, wherein the recombinant host cell is transduced with a recombinant vector comprising a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase.

30. The recombinant host cell of claim 29, wherein the purified nucleic acid segment encodes the *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase of SEQ ID NO:2.

31. The recombinant host cell of claim 29, wherein the purified nucleic acid segment comprises a nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1.

32. The recombinant host cell of claim 31, wherein the host cell produces hyaluronic acid.

33. The recombinant host cell of claim 29, wherein the enzymatically active hyaluronan synthase is capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified structure.

34. The recombinant host cell of claim 29, wherein the enzymatically active hyaluronan synthase is capable of producing a hyaluronic acid polymer having a modified size distribution.

35. A purified composition, wherein the purified composition comprises an enzymatically active hyaluronan synthase polypeptide.

36. A purified composition, wherein the purified composition comprises a polypeptide having an amino acid sequence in accordance with SEQ ID NO:2.

37. A method for detecting a *D* species, comprising the steps of:

obtaining a DNA sample;

contacting the DNA sample with a purified nucleic acid segment

5 in accordance with SEQ ID NO:1;

hybridizing the DNA sample with the purified nucleic acid segment thereby forming a hybridized complex; and

detecting the complex.

38. A method for detecting a bacterial cell that expresses mRNA encoding *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase, comprising the steps of:

obtaining a bacterial cell sample;

5 contacting at least one nucleic acid from the bacterial cell sample with purified nucleic acid segment in accordance with SEQ ID NO:1;

hybridizing the at least one nucleic acid and the purified nucleic acid segment thereby forming a hybridized complex;

10 and

detecting the hybridized complex, wherein the presence of the hybridized complex is indicative of a bacterial strain that expresses mRNA encoding *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase.

39. A method for producing hyaluronic acid, comprising the steps of:

introducing a purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active hyaluronan synthase into a host organism, wherein the host organism contains nucleic acid segments encoding enzymes which produce UDP-GlcNAc and UDP-GlcA;

growing the host organism in a medium to secrete hyaluronic acid; and

recovering the secreted hyaluronic acid.

40. The method according to claim 39, wherein the step of recovering the hyaluronic acid comprises extracting the secreted hyaluronic acid from the medium.

41. The method according to claim 40, further comprising the step of purifying the extracted hyaluronic acid.

42. The method according to claim 39, wherein in the step of growing the host organism, the host organism secretes a structurally modified hyaluronic acid.

43. The method according to claim 39, wherein in the step of growing the host organism, the host organism secretes a hyaluronic acid having a modified size.

44. A pharmaceutical composition comprising a preselected pharmaceutical drug and an effective amount of hyaluronic acid produced by hyaluronan synthase.

45. The pharmaceutical composition of claim 44, wherein the hyaluronic acid is produced by the *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase of SEQ ID NO:2 —

46. The pharmaceutical composition according to claim 44, wherein the molecular weight of the hyaluronic acid is modified thereby producing a modified molecular weight pharmaceutical composition capable of evading an immune response.

47. The pharmaceutical composition according to claim 44, wherein the molecular weight of the hyaluronic acid is modified thereby producing a modified molecular weight pharmaceutical composition capable of targeting specific tissue or cell type within the patient having an affinity for the modified molecular weight pharmaceutical composition.

48. A purified and isolated nucleic acid sequence encoding enzymatically active hyaluronan synthase, the nucleic acid sequence selected from the group consisting of:

- (a) the nucleic acid sequence in accordance with SEQ ID NO:1;
- (b) complementary nucleic acid sequences to the nucleic acid sequence in accordance with SEQ ID NO:1;

- (c) nucleic acid sequences which will hybridize to the nucleic acid in accordance with SEQ ID NO:1;
- (d) nucleic acid sequences which will hybridize to the complementary nucleic acid sequences of SEQ ID NO:1; and
- (e) nucleic acid sequences which will hybridize to PCR probes selected from the group consisting of PCR probes of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6.

49. A purified and isolated nucleic acid segment consisting essentially of a nucleic acid segment encoding enzymatically active hyaluronan synthase.

50. A procaryotic or eucaryotic host cell transformed or transfected with an isolated nucleic acid segment according to claim 1, 2, or 3 in a manner allowing the host cell to express hyaluronic acid.

51. An isolated nucleic acid segment consisting essentially of a nucleic acid segment encoding hyaluronan synthase having a nucleic acid segment sufficiently duplicative of the nucleic acid segment in accordance of SEQ ID NO:1 to allow possession of the biological property of encoding for *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase.

52. A cDNA sequence according to claim 51.

53. A procaryotic or eucaryotic host cell transformed or transfected with a nucleic acid segment according to claim 51 in a manner allowing the host cell to express hyaluronic acid.

54. A purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active hyaluronan synthase, wherein the purified nucleic acid segment is capable of hybridizing to the nucleotide sequence in accordance with SEQ ID NO:1.

55. A purified nucleic acid segment according to SEQ ID NO:3 capable of hybridizing to SEQ ID NO:1.

56. A purified nucleic acid segment according to SEQ ID NO:4 capable of hybridizing to SEQ ID NO:1.

57. A purified nucleic acid segment according to SEQ ID NO:5 capable of hybridizing to SEQ ID NO:1.

58. A purified nucleic acid segment according to SEQ ID NO:6 capable of hybridizing to SEQ ID NO:1.

59. A purified nucleic acid segment having a coding region encoding enzymatically active hyaluronate synthase, the purified nucleic acid segment selected from the group consisting of:

(A) the nucleic acid segment according to SEQ ID NO: 2;

- 5            (B) the nucleotide sequence in accordance with SEQ ID.  
             NO: 1;
- (C) nucleic acid segments which hybridize to the nucleic  
             acid segments defined in (A) or (B) or fragments  
             thereof; and
- 10           (D) nucleic acid segments which but for the degeneracy  
             of the genetic code, or encoding of functionally  
             equivalent amino acids, would hybridize to the  
             nucleic acid segments defined in (A), (B), and (C).



60. A purified nucleic acid segment comprising a coding region encoding hyaluronate synthase.
61. A recombinant vector wherein the recombinant vector further comprises a purified nucleic acid segment having a coding region encoding hyaluronan synthase.
62. A recombinant host cell, wherein the host cell is transformed with a recombinant vector comprising a purified nucleic acid segment having a coding region encoding hyaluronan synthase.
63. A recombinant host cell, wherein the recombinant host cell is transfected with a recombinant vector comprising a purified nucleic acid segment having a coding region encoding hyaluronan synthase.
64. A recombinant host cell, wherein the recombinant host cell includes a recombinant vector, wherein the recombinant vector comprises a purified nucleic acid segment having a coding region encoding hyaluronan synthase.
65. A purified composition, wherein the purified composition comprises a hyaluronan synthase polypeptide.
66. A method for detecting a DNA species, comprising the steps of:
  - contacting a DNA sample with a purified nucleic acid segment,
  - hybridizing the DNA sample and the purified nucleic acid segment thereby forming a hybridized complex;
  - and detecting the complex.
67. A method for detecting a bacterial cell that expresses mRNA encoding *Streptococcus equisimilis* hyaluronan synthase, comprising the steps of:
  - contacting at least one nucleic acid from a bacterial cell sample with a purified nucleic acid segment;
  - hybridizing the at least one nucleic acid and the purified nucleic acid segment

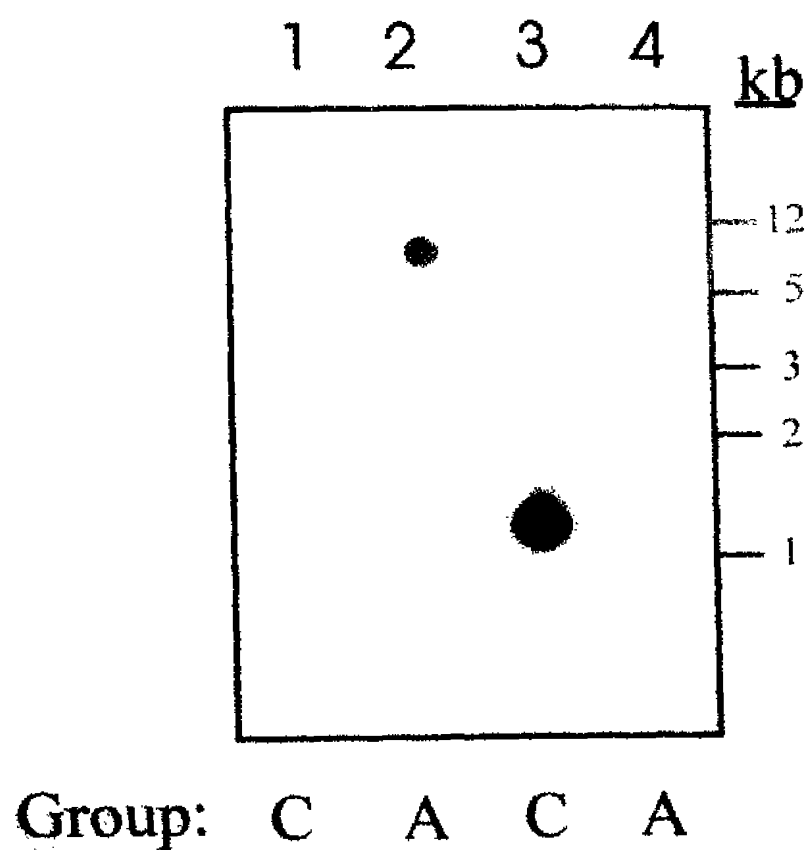
thereby forming a hybridized complex; and  
detecting the hybridized complex.

68. A method for producing hyaluronic acid, comprising the steps of:  
introducing a purified nucleic acid segment having a coding region encoding  
hyaluronan synthase into a host organism;  
growing the host organism to secrete hyaluronic acid; and  
recovering the secreted hyaluronic acid.
69. A purified and isolated nucleic acid segment comprising a nucleic acid segment  
encoding hyaluronan synthase.
70. An isolated nucleic acid segment comprising a nucleic acid segment encoding  
hyaluronan synthase.
71. A cDNA sequence according to claim 70.

---

2

---

**Fig. 1**

---

2

---

cvHAS	MG--KNIIIM	VSMYTIITS-	-----NL	IAVGGASLIH	APAITGVVLH	39
seHAS	MRTLKHLIT-	-----V	VAFSIFWVLI	I-----VNV		25
spHAS	VPIFKTLI-	-----V	LSPIFLISIH	I-----LNM		25
huHAS	MHCERFLCIL	RI---IGTTL	-----FGVSLI	LGITAAIVG		33
xlHAS	NK-EKAAETH	EYPEGIPKDL	EPKHPTLWRI	IYXSFVGVLI	ATITAAVAE	49
cvHAS	WNIALST--I	WGVSATGIFV	FGFFLAQVLF	SELNRKRRLK	WISLRPKGMN	87
seHAS	YLFGAKG---	-SLSIYGFLL	IAYLLVKMSL	SFF-YKPFKG	R---AGQ--Y	65
spHAS	YLPGT-S---	-TVGIYGVIL	ITILVIKGL	SFL-YEPFKG	N---PHD--Y	64
huHAS	YQFIQTNY	FSFGLYGAF	ASHLIQSLF	AFLEHRMKK	SLETFIK--L	81
xlHAS	FQVLKHEAIL	FSLGLYGLAM	LLHLMQSLF	AFLEIRRVNK	S-ELPCS--F	96
cvHAS	DVRLXVITAG	FREDPYMFOK	CHSVRDSN	GNVA-RLICV	IGDDEDDMR	136
seHAS	K--VAATIPS	KNEDAESLLE	TKKSVQOQT	PLAE--IYVV	DGGSADETGI	111
spHAS	K--VAATIPS	KNEDAESLLE	TKKSVLAQT	PLSE--IYIV	DGGSSENTDAI	110
huHAS	NKTVLCLDAA	KCEDPDYLRK	CHCKVKRLT	PG--IKVVMV	IGDSEDDLY	129
xlHAS	KKTVALTEAG	KQENPEYLIK	CHCKKYVK	PKDKLKILV	IGDNTEDDAY	146
cvHAS	MAAVYKAIYM	DN-----	-----IKKPE	-----FV	LCESDDKEGE	165
seHAS	KR-----	---IEDYVRO	-----	TGOLSSNVIV	HRSEKNQCKR	140
spHAS	QL-----	---IEEYVNR	-----	EVDIRNVIV	HRSLVNKGKR	139
huHAS	MMDIFSEVMG	RDKSATYINK	NNFHE-KGPG	ETDES-----	-----HKESS	168
xlHAS	MHEMFKDVFN	GEDVGTYYVK	GNVHTVKKPE	ETNKGSCPEV	SKPLNEDEGI	196
cvHAS	RIDSOF---S	RDICVLQPHR	GKRECLYTG	OLAKMDPSVN	AVVLIDSDTV	212
seHAS	HA-----	-----QAN-	-----AE	E--RSDADV-	FLTV-SDDTY	163
spHAS	HA-----	-----QAN-	-----AE	E--RSDADV-	FLTV-SDDTY	162
huHAS	QHVTOVLVSN	KSICIMQKMG	GKREVMYTA	R--ALGRSVD	YVQVCSDTM	216
xlHAS	NHVEELVRNK	RCVCIMQMG	GKREVMYTA	Q--AIGTSVD	YVQVCSDTM	244
cvHAS	LEKDAILEVV	YPLACDPEIO	AVAGECKIWS	T-DTLISLLV	AWAYYSACV	261
seHAS	IYPDALEELL	KTFNDPTVFA	ATG-HLNVNR	RQTNLLTRLT	DIFDNAGV	212
spHAS	IYPDALEELL	KTFNDPTVFA	ATG-HLNVNR	RQTNLLTRLT	DIFDNAGV	211
huHAS	LDPASSEVMV	KVLEEDPMVG	GVGGDVQILN	KYDSWISFLS	SVRYWANI	266
xlHAS	LDELATVEMV	KVLESNDNYG	AVGGDVRIIN	PYDSFISFMS	SIRYWMANV	294
cvHAS	ERSAQSFRT	VOCVGGELGA	FKIDIKEIK	DPWISQRELE	QKCTYQDDR	311
seHAS	ERAAQSVTGN	ILVCSGPLEV	YRREVVPNI	DYINQTELG	IPVSIQDDRC	262
spHAS	ERAAQSVTGN	ILVCSGPLEV	YRREVVPNI	ERYKNQTELE	LPVSIQDDRC	261
huHAS	ERACQSYFDC	VOCISGELGM	YRNSLLHEFV	EDWYNQCEMG	NOCSFQDDRN	316
xlHAS	ERACQSYFDC	VOCISGELGM	YRNNILOVFL	EAWYRQKELS	TYCTLGDDRH	344
cvHAS	LTHNLMRQK	KVVFPPFANG	WSDSETNVIR	YIVQTEFSE	SWCFEINYTL	361
seHAS	LTHYATDLE-	KTVYQSTAKC	ITDVEHDMST	YLKQONRNR	SFFRESIISV	311
spHAS	LTHYATDLE-	KTVYQSTAKC	ITDVEHDMST	YLKQONRNR	SFFRESIISV	310
huHAS	LTHRVLSLGY	ATKYTARSKC	LTETIEYLA	WLNQOTRMSK	SYFREWLINA	366
xlHAS	LTHRVLSLGY	RTKYTHKSPA	FSETLSLYLR	WLNQOTRMTK	SYFREWLINA	394
cvHAS	FAANKHGLSG	ILAFECCLYQ	ITYFFLVIVL	FSRLAVEADF	RAQTATVIVS	411
seHAS	KKIMNNPFVA	LHTILEVSMF	MMLVYSVVDV	FVGNVREFDW	LRVLAFVIV	361
spHAS	KKILSNPIVA	LHTIEVVVME	MMLIVAIGNL	LPNQAIQLDL	TKLFAFLSII	360
huHAS	MMFHKKH---	LHNTYEAIT	GEFFFLIAT	VIOLFYRGKI	WNILLFLLTV	413
xlHAS	QMMHKKH---	LHNTYESVVS	PIFFPFITAT	VIRLIYAGTI	WNVWLLLCI	441
cvHAS	TTVAIKICGY	FSFRANDIRA	FYFV-LYTFV	YFFCMIFARI	TAMMLWDIG	460
seHAS	FIVACRNTH	YM--LKHPLS	FLLSPFYGV	HLFVLOPLKL	YSLFIRNAD	409
spHAS	FIVACRNTH	YM--LKHPLS	FLLSPFYGV	HLFVLOPLKL	YSLCIRKNT	408
huHAS	QLVGHKSS-	FASCLRGNIV	MVMSLSVVL	YMSLLAKM	FAIATINKAG	462
xlHAS	QIMSFKSI-	YACNLRCNFI	MLLSLSYML	YMTGLLESKY	FALLILNKTE	490
cvHAS	NDTRCCNEKP	SVGTRVALMA	KQYLIAYMW	AAVVGAGVYS	IVHNMFDWN	510
seHAS	WGH-----	RRK L-----	-----	-----L*		417
spHAS	WGH-----	RRK V-----	-----	-----T	IFK*	419
huHAS	WGTSG--RKT	IVNVFIGL--	---IPVSVMF	TILLGGVIFT	IKESKRQFS	505
xlHAS	WGTSG--RKT	IVGNMPTI--	---LPLSINA	AVLCGGVGYS	IYMDQNDWS	533
cvHAS	S-----LSYR	FALVGIC-SY	IVFIVIVLVV	YFTGKITTWN	FTKLQKELIE	554
huHAS	ES-KQTVLIV	GTLLYAC---	--YWMLLTL	YV---VLINK	CGRRKKQGY	546
xlHAS	TPEKOKEMY-	LHLYGCVGY	VYWMVMAVM	YH---VWVKR	CCR-KRSQTV	577
cvHAS	DRVLYDATTN	AQSV*				568
huHAS	DMVL-----	DV*				552
xlHAS	TLVH-----	DI POMCV*				588

FIG. 2

---

21

---

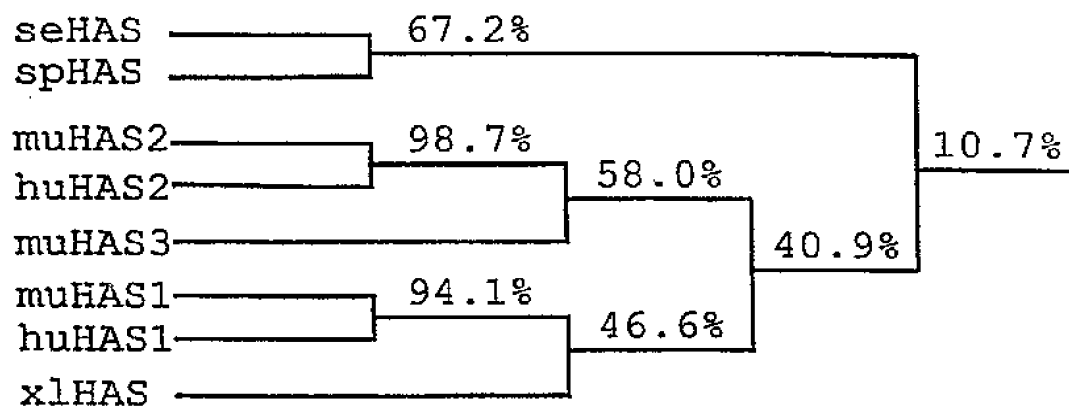


FIG. 3



---

11

---

SIZE DISTRIBUTION OF HYALURONAN  
PRODUCED BY DIFFERENT ENGINEERED  
STREPTOCOCCAL HAS ENZYMES

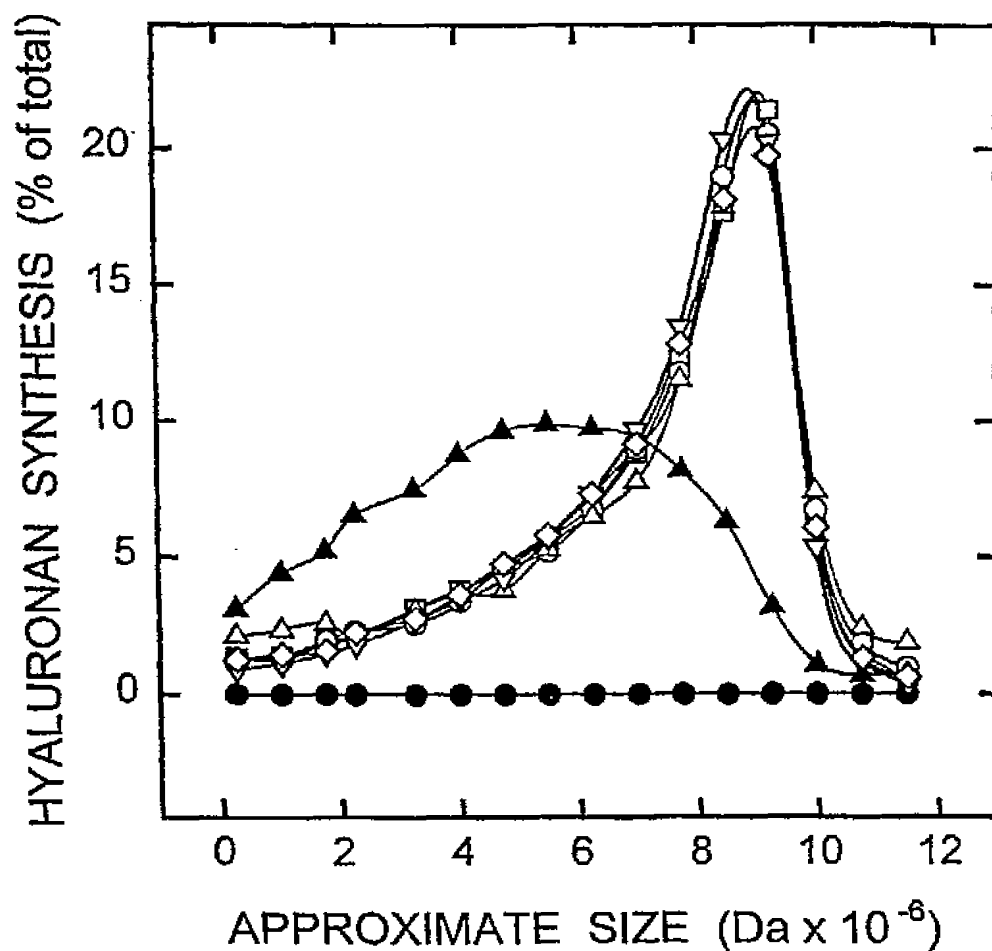
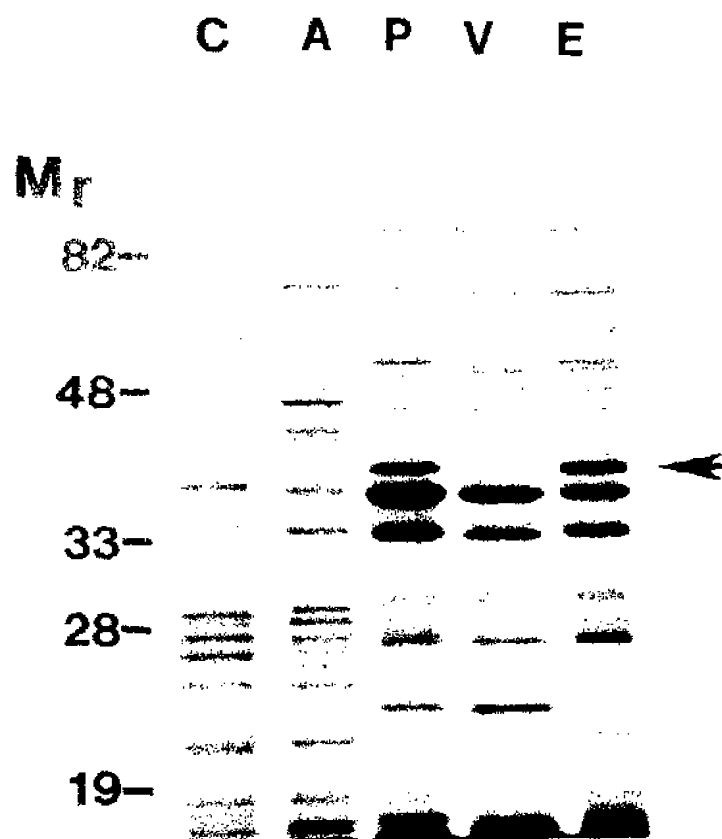


FIG. 4

---

2

---

**Fig. 5**

---

12

---

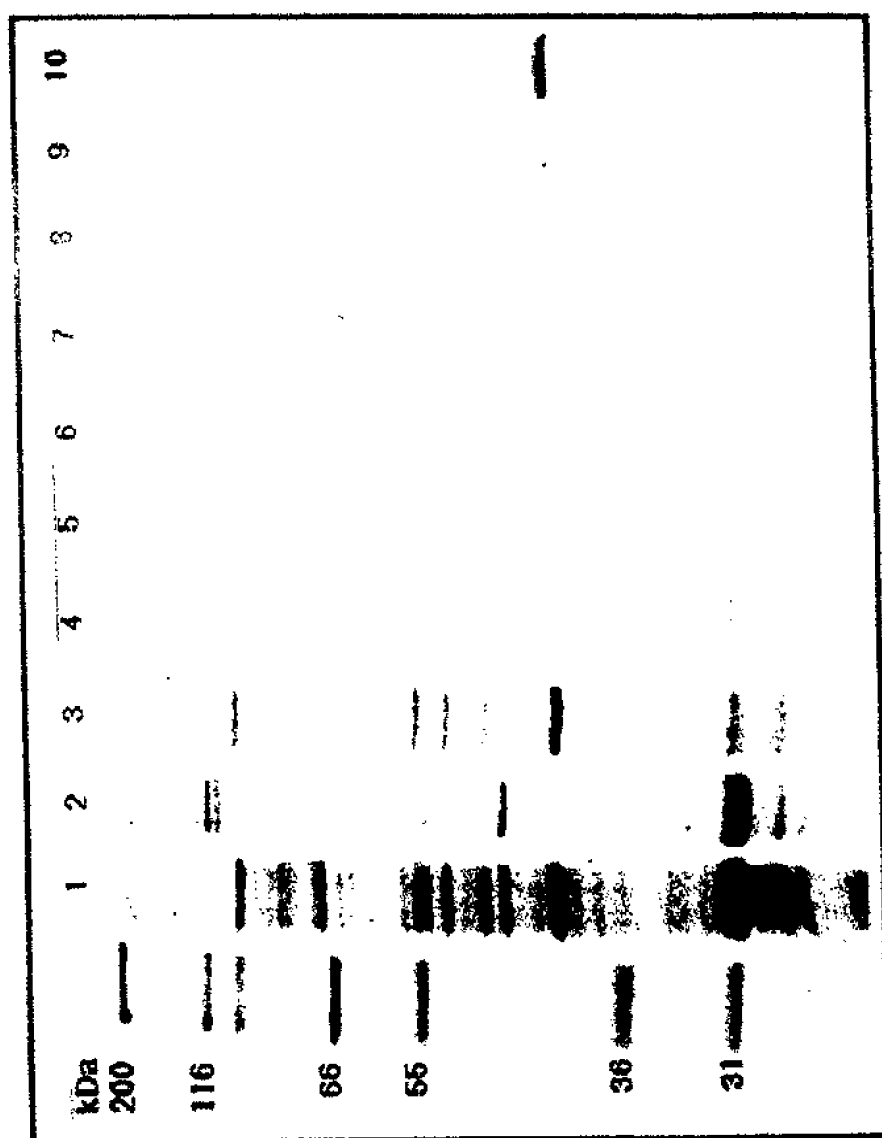


Fig. 6

---

12

---

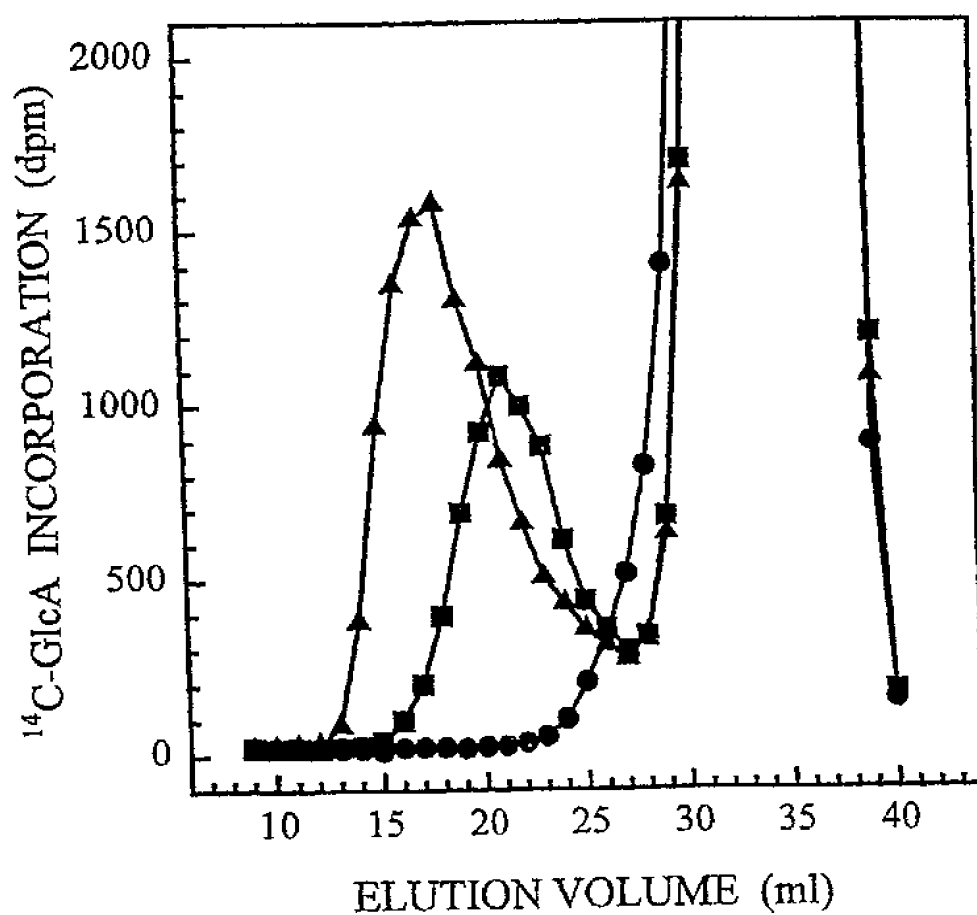


FIG. 7



---

2

---

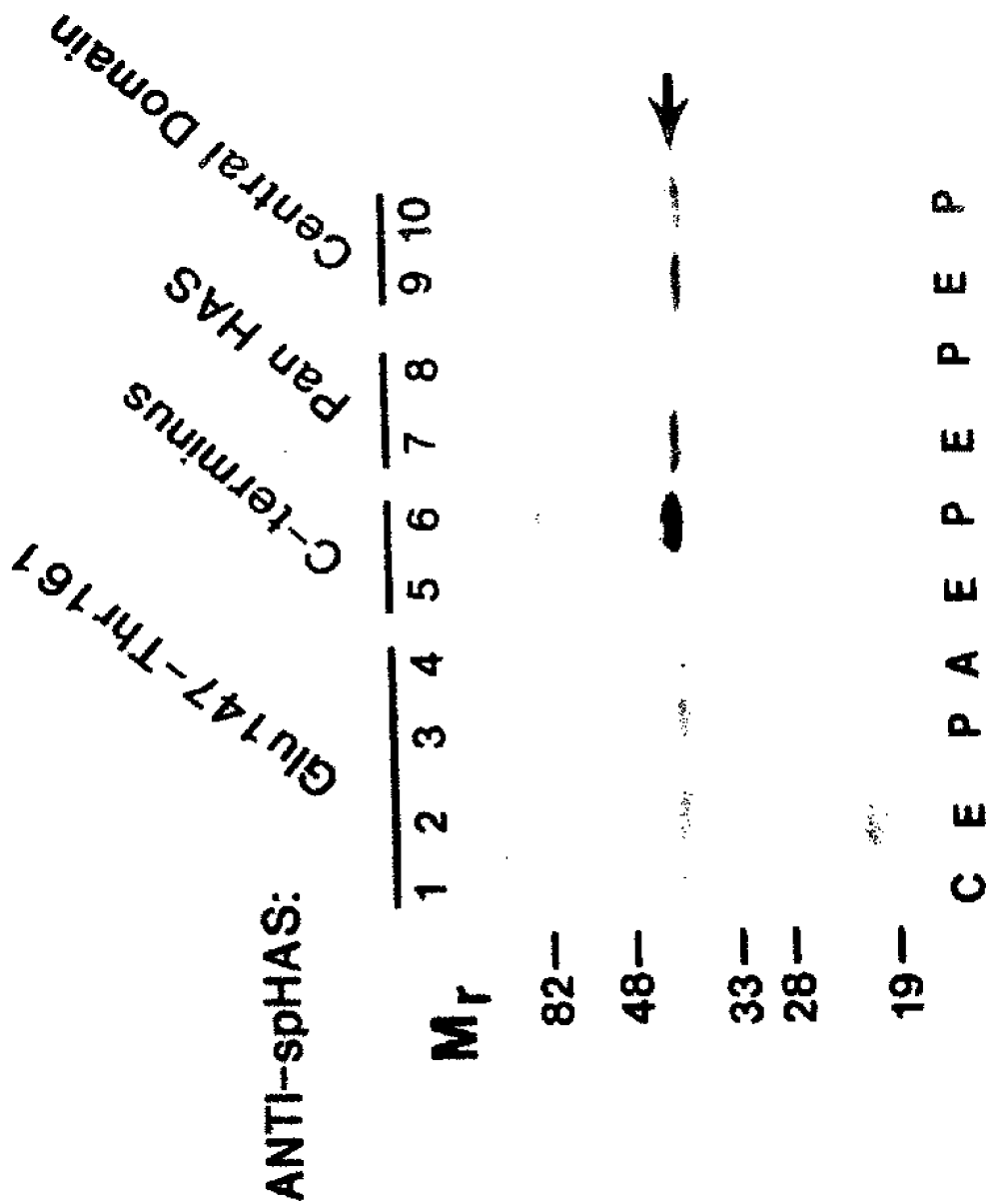


Fig. 8

---

R

---

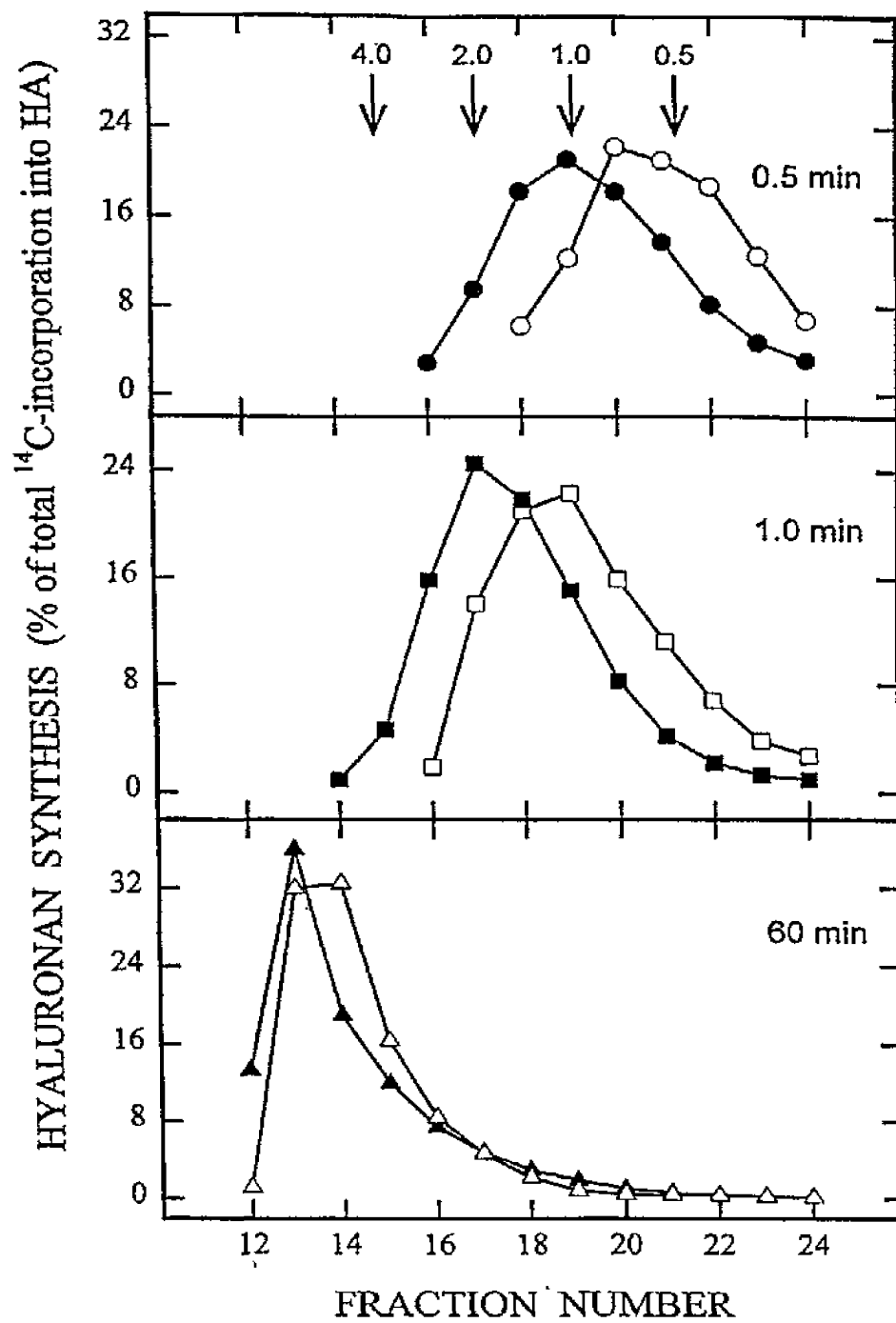


FIG. 9

---

12

---

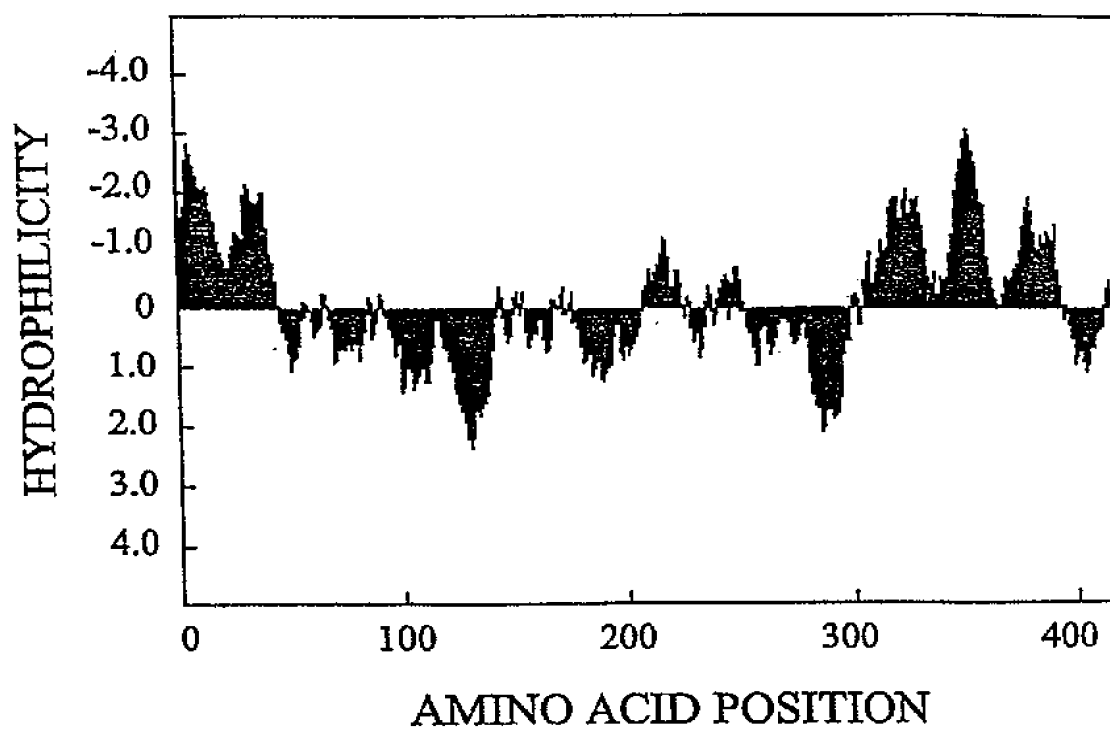


FIG. 10

---

12

---

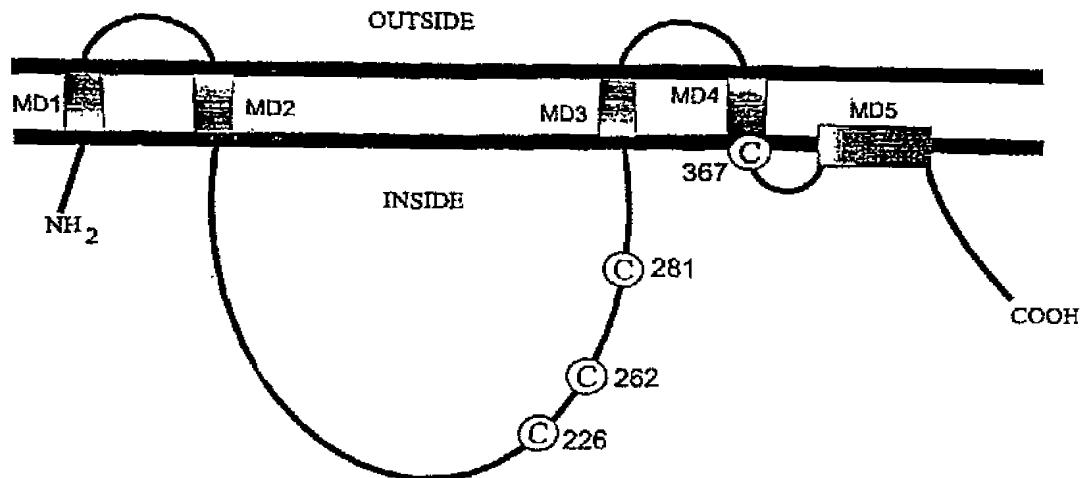


FIG. 11



---

2

---

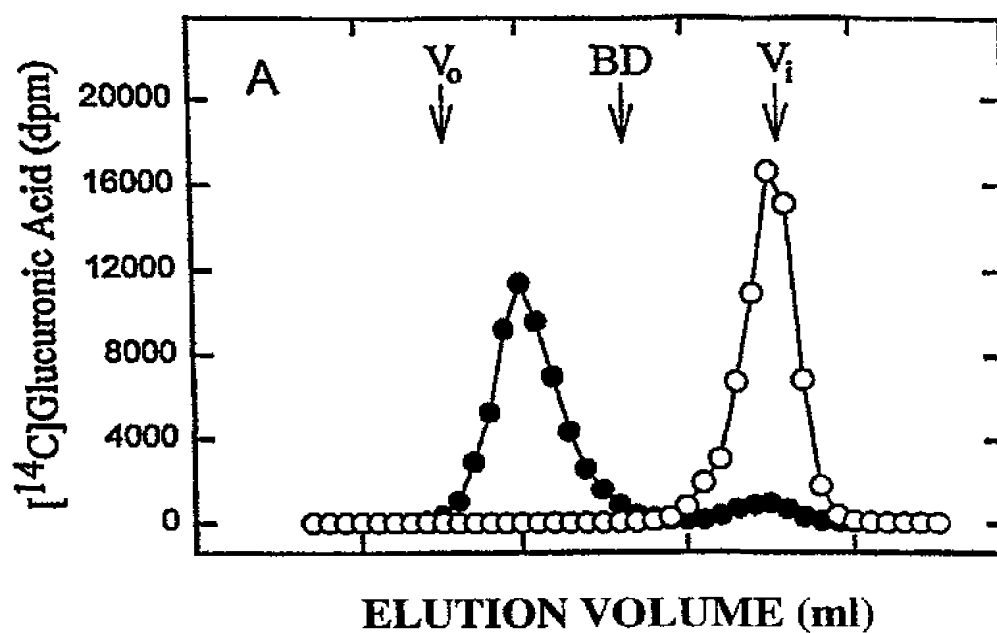


Fig. 12A

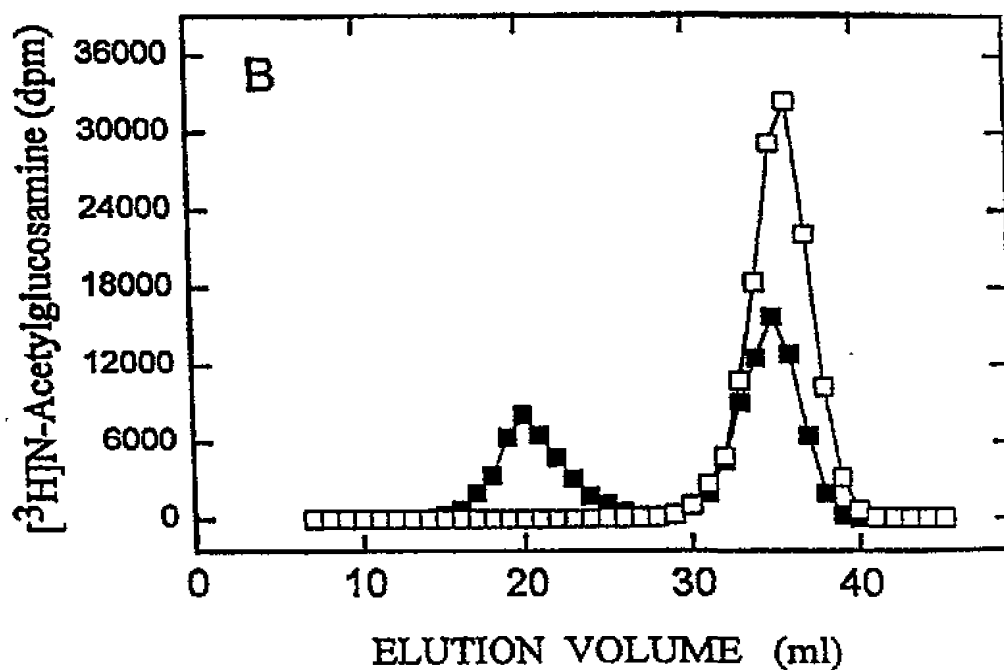
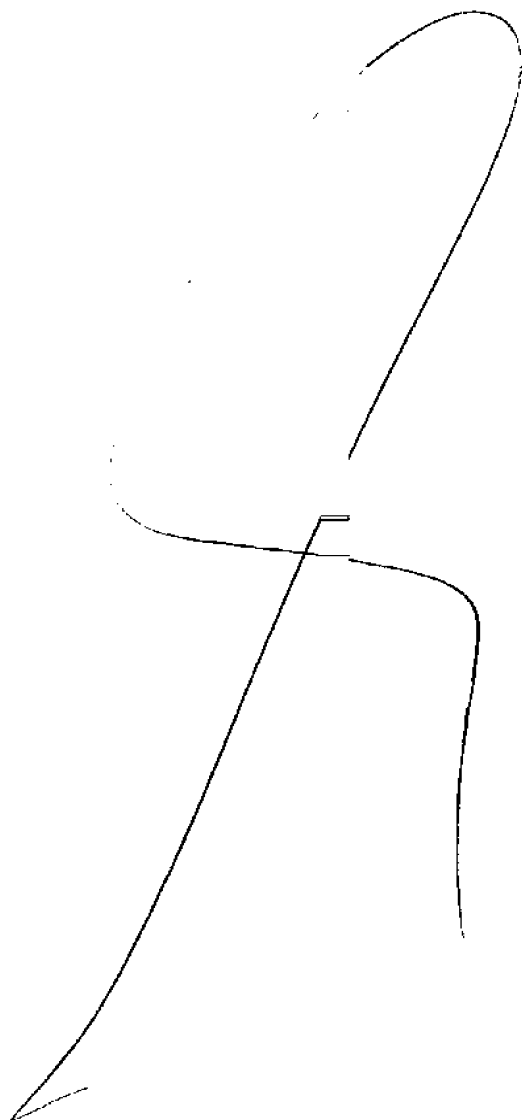


Fig. 12B



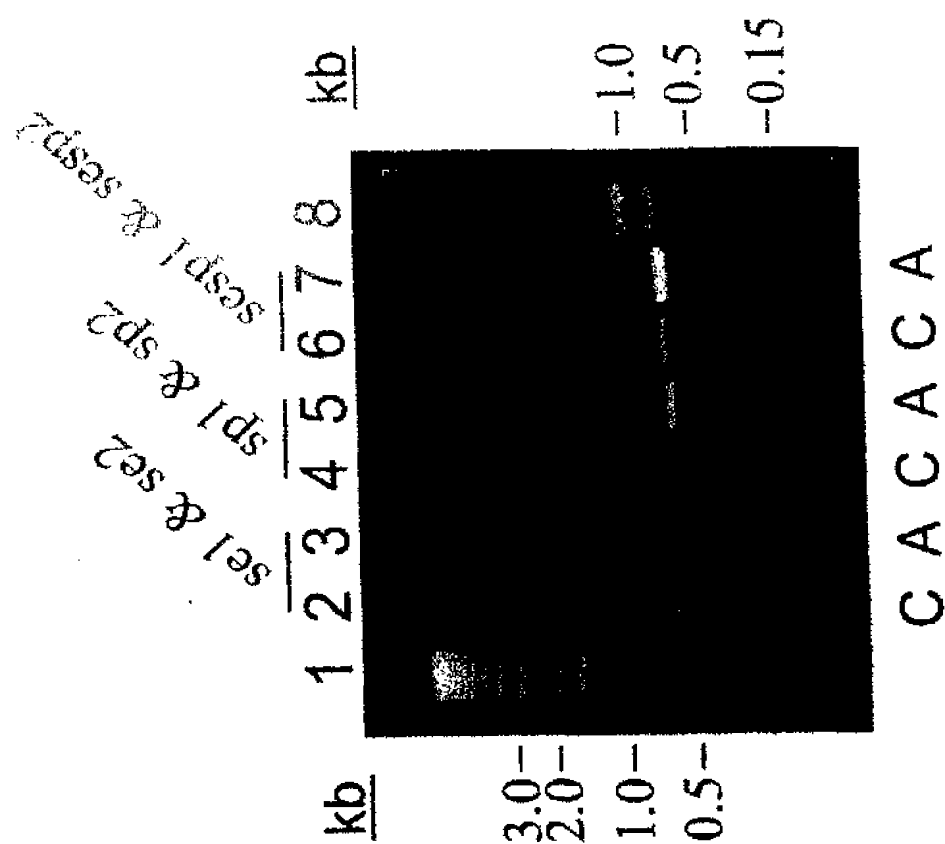


Fig. 13

---

8

---

atgagaacattaaaaaacctcataactgttggtggccttagtatTTTTTgggtactgttgatttacgtcaat 72  
 gtttatctctttgggtgctaaaggaagcttgtcaatttatggctTTTTTgctgatagcttacctatttagtcaaa 144  
 atgtccttatcctTTTTTTTacaagccatttaaggggaagggctgggcaatataagggttcagocattattccc 216  
 tcttataacgaagatgctgagtcattgctagagaccttaaaaaagtgttcagcagcaaacctatccccctagca 288  
 gaaatttatgttggtgacgatggaagtGCTGATGAGACAGGTATTAGCGcattgaagactatgtgcgtgac 360  
 actggtgacctatcaagcaatgtcattgttcatcggtcagagaaaaatcaaggaaagcgtcatgcacaggcc 432  
 tgggcctttgaaagatcagacgctgatgtctTTTTtgaccgttGACTCAGATACTTATATCTAccctgatgct 504  
 ttagaggagttgttaaaaacctttaatgacccaactgtTTTTTgctgcgacgggtcaccttaatgtcagaaat 576  
 agacaaaccaatctcttaacacgcttgacagatattcgctatgataatgctTTTTTggcgttgaacgagctgcc 648  
 caatcogttacaggtaatatccttgtttgctcaggtccgcttagcgTTTTTcagacgcgaggtggttctcct 720  
 aacatagatagatacatcaaccagaccttccctgggtattcctgttaagtattgggtgatgacaggtgcttgacc 792  
 aactatgcaactgatttaggaaagactgtttatcaatccactgctaaatgtattacagatgttccctgacaag 864  
 atgtctacttacttgaagcagcaaaaccgctggaacaagtccctcttttagagagtcattatttctgttaag 936  
 aaaatcatgaacaatcctTTTTTtagccctatggaccatacttgaggtgtctatgtttatgatgcttgtttat 1008  
 tctgtgggtggatttctttgtagGCAATGTCAGAGAAATTGATtggtcagggttttagcctttctggtgatt 1080  
 atcttcattgttgcctgtgtcggaacattcattacatgcttaagcaccogctgtccttcttgttatctcog 1152  
 ttttatgggggtgctgcatttgtttgtcctacagcccttgaattatatattctcttttactattagaaatgct 1224  
 ← sesp2  
 gactGGGGCAACACGTAAAAAattattataa 1254

FIG. 14

---

12

---

1 / 8

ATGAGAACATTAAAAACCTCATAACTGTTGTGGCCTTTAGTATTTTTGGGTACTGTTGATTACGTCAAT	72
GTTTATCTCTTTGGTGCTAAAGGAAGCTTGTCAATTTATGGCTTTTGTCTGATAGCTTACCTATTAGTCAA	144
ATGTCCTTATCCTTTTTTACAAGCCATTAAAGGAAGGGCTGGGCAATATAAGGTTGCAGCCATTATTCCC	216
TCTTATAACGAAGATGCTGAGTCATTGCTAGAGACCTTAAAAAGTGTTCAGCAGCAAACCTATCCCCTAGCA	288
GAAATTTATGTTGTTGACGATGGAAGTGCTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAAGACTATGTGCGTGAC	360
ACTGGTGACCTATCAAGCAATGTCATTGTTTCATCGGTCAGAGAAAAATCAAGGAAGCGTCATGCACAGGCC	432
TGGGCCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTTTGACCGTTGACTCAGATACTTATATCTACCCCTGATGCT	504
TTAGAGGAGTTGTTAAAAACCTTTAATGACCCAACTGTTTTTGTCTGCGACGGGTCACCTTAATGTCAAGAA	576
AGACAAACCAATCTCTTAACACGCTTGACAGATATTCGCTATGATAATGCTTTTGGCGTTGAACGAGCTGCC	648
CAATCCGTTACAGGTAATATCCTTGTTGCTCAGGTCCGCTTAGCGTTTACAGACGCGAGGTGTTGTTCCCT	720
AACATAGATAGATACATCAACCAGACCTTCCTGGGTATTCTGTAAAGTATTGGTGATGACAGGTGCTTGACC	792
AACTATGCAACTGATTTAGGAAGACTGTTTATCAATCCACTGCTAAATGTATTACAGATGTTCCCTGACAAG	864
ATGTCTACTTACTTGAAGCAGCAAAACCGCTGGAACAAGTCCTTCTTTAGAGAGTCCATTATTTCTGTTAAG	936
AAAATCATGAACAATCCTTTGTAGCCCTATGGACCATACTTGAGGTGTCATGTTTATGATGCTTGTTTAT	1008
TCTGTGGTGGATTTCCTTTGAGGCAATGTCAGAGAAATTTGATTGGCTCAGGGTTTTAGCCCTTCTGGTGATT	1080
ATCTTCATTGTTGCCCTGTGTGCGAACATTCAATTACATGCTTAAGCACCCGCTGTCCTTCTTGTTATCTCCG	1152
TTTTATGGGGTGCTGCATTGTTTGTCTACAGCCCTTGAAATTATATTCTCTTTTACTATTAGAAATGCT	1224
GACTGGGGAACACGTAAAAAATTATTATAA	1254

SEQUENCE ID NO. 1



---

12

M R T L K N <u>L I T V V A F S I F W V J L I Y V N</u>	24
V Y L F G A K G S L S <u>I Y G F L L I A Y L L V E</u>	48
<del>M S R L S S F F F Y K</del> P F K G R A G Q Y K V A A I I P	72
S Y N E D A E S L L E T L K S V Q Q Q T Y P L A	96
E I Y V V D D G S A D E T G I K R I E D Y V R D	120
T G D L S S N V I V H R S E K N Q G K R H A Q A	144
W A F E R S D A D V F L T V C S D T Y I Y E D A	168
L E E L L K T F N D P T V F A A T G H L N V R N	192
R O T N L L I R L T D I R Y D N A F G V E R A A	216
Q S V T G N I L V C S G P L S V Y K R E V V V F	240
N I D R Y I N Q T F L G I F V S I G D D R C L T	264
N Y A T D L G <del>K T V R I Y S O S P T E A N K</del> C I T D V P D K	288
K S T Y L K Q Q N R W N K S F F R E S I I S V K	312
K I M N N P F <u>V A L W T I L E V S M F M N L V Y</u>	336
<u>S V V D F F V G N V P E F D W L P V L A F L V I</u>	360
<u>I F I V A L C F N I P Y K L K H P L S F I L S P</u>	384
<u>F Y G V L H L F V L Q P L</u> <del>R V L S Y E S S L S F A T T I E R</del> N A	408
D W G T R K K L L *	417

SEQUENCE ID NO. 2

---

12

3 / 8

SEQUENCE ID NO. 3

5'-GCTGATGAGACAGGTATTAAGC

primer: se1 (sense, nucleotides G<sup>316</sup> - C<sup>337</sup>)

SEQUENCE ID NO. 4

5'-ATCAAATTCTCTGACATTGC

primer: se2 (antisense, for sense nucleotides G<sup>1031</sup> - T<sup>1050</sup>)

SEQUENCE ID NO. 5

5'-GACTCAGATACTTATATCTA

primer: sesp1 (sense, for nucleotides G<sup>475</sup> - A<sup>494</sup>)

SEQUENCE ID NO. 6

5'-TTTTTACGTGTTCCCCA

primer: sesp2 (antisense, for sense nucleotides T<sup>1228</sup> - A<sup>1244</sup>)

---

12

---

4 / 8

Protein sequence of A98R, the PBCV-1 HA synthase

```
1   MGKNIIIMVS WYTIITSNLI AVGGASLILA PAITGYVLHW NIALSTINGV SAYGIFVFGF
61   FLAQVLESEL NRKRLRKWIS LRPKGWNQVR LAVILAGYRE DPYMFQKCLE SVRDSQYGNV
121  ARLICVIDGD EDDDMRMAAV YKAIYNDNIK KPEFVLCESD DKEGERIDSD FSRDICVLQP
181  HRGKRECLYT GFQLAKMDPS VNAVVLIDSD TVLEKDAILE VVYPLACDPE IQAVAGECKI
241  WNTDTLLSLL VAWRYYSAPC VERSAQSFPR TVQCVGGPLG AYKDIKEIK DPWISQRFGL
301  QKCTYGDQRR LTNEILMRGK KVVFTPFVAVG WSDSPTNVER YIVQQTRWSK SWCREINTTL
361  EAAWKHGLSG IWLAFECLYQ IYFFLVIIYL FSRLAVEADP RAQTATVIVS TTVALIKCGY
421  FSFRKDIRA FYFVLYTEFY FFCMIPARIT AMHILWDIGW DTRGGNEKPS VGTRVALWAK
481  QYLIAYMWA AVVGAGVYSI VHNMMFDWNS LSYRFALVGI CSYIVFIVIV LVVYFTGKIT
541  TWNETKLQKE LIEDRVLYDA TTNAQSV
```

567

SEQUENCE ID NO. 7

---

12

5 / 8

## Nucleotide Sequence of A98R gene in the PBCV-1 Virus Genome

Start: ATG 50901 Stop: TGA 52607

```
50881 aagacttctt gaaagttaca ATGggtaaaa atataatcat aatggtttcg tggtaacca
50941 tcataacttc aaatctaate gcggttgag gagcctctct aatcttggtt ccggcaatta
51001 ctgggtatgt tctacattgg aatattgctc tctcgacaat ctggggagta tcagcttatg
51061 gtattttcgt ttttgggttt ttccttgac aagttttatt ttcagaactg aacaggaaac
51121 gtcttcgcaa gtggattttc ctcagaccta aggggttgaa tgatgttcgt ttggctgtga
51181 tcattgctgg atatcgcgag gatccttata tgttcagaa gtgcctcgag tctgtacgtg
51241 actctgatta tggcaacgtt gcccgctga tttgtgtgat tgacggtgat gaggacgatg
51301 atatgaggat ggctgcggtt tacaaggcga tctacaatga taatatcaag aagccogagt
51361 ttgttctgtg tgagtccagc gacaagggaag gtgaacgcac cgactctgat ttctctcgcg
51421 acattttgtg cctccagcct catcgtggaa aacgggagtg tctttatact gggtttcaac
51481 ttgcaaagat ggacccaggt gtcaatgctg tcgttctgat tgacagcgat accgtttctg
51541 agaaggatgc tattctggaa gttgtatacc caacttcgat cgatcccgag atccaaagcg
51601 ttgcaggatga gtgtaagatt tggaaacacg acactctttt gagtcttctc gtccgttggc
51661 ggtactattc tgcgttttgt gtggagagga gtgccagtc ttttttoagg actgttcagt
51721 gcgttggggg gccactgggt gccacaaga ttgatataat taaggagatt aaggacccct
51781 ggatttccca gcgctttctt ggtcagaagt gtaactacgg tgacgacgcg ccgctaacca
51841 acgagatctt gatgcgtggt aaaaagggtg tgttcaactc atttgcgttt ggttgggtcg
51901 acagtcggac caatgtgttt cggtaacatg ttacgacgac ccgctggagt aagtcgtggt
51961 gcgcgaaaat ttggtacacc ctcttcgccc cgtggaagca cggtttgtct ggaatttggc
52021 tggcctttga atgtttgtat caaattacat acttcttctt cgtgatttac ctcttttctc
52081 gcttagcgtg tgaggccgac cctcgcgcc agacagccac ggtgattgtg agcaccacgg
52141 ttgcattgat taagtgtggg tatttttcat tccgagccaa ggtatattcg gcgttttact
52201 ttgtgcttta tacatttgtt tactttttct gtatgattcc gccaggatt actgcaatga
52261 tgacgctttg ggacattggc tgggatactc gcggtggaaa cgagaagcct tccgttggca
52321 ccgggttcgc tctgtgggca aagcaatata tcattgcata tatgtgttgg gccgcggttg
52381 ttggcgctgg agtttacage atcgtccata actggatggt cgatttgaat tctctttctt
52441 atcgttttgc tttggttggg atttgttctt acattgtttt tattgttatt gtgcgtgtgg
52501 tttatttcac cggcaaaatt acgaacttga atttcacgaa gcttcagaag gactaatcg
52561 aggatcgctg tctgtacgat gcaactacca atgctcagtc tctgtGAttt ttcttgcaag
```

SEQUENCE ID NO. 8



---

17

---

6 / 8

Nucleotide and Protein Sequence of *Pasteurella multocida*

1 M N T L S Q A I K A Y N S N D Y Q  
-18 ATTTTSTAAGGACAGAAATGAATACATTATCACAAGCAATAAAAGCATATAACAGCAATGACTATCAA  
18 L A L K L F E K S A E I Y G R K I V E F Q I T  
52 TTAGCACTCAAATTATTTGAAAAGTCGGCGGAAATCTATGGACGGAAATTTGTTGAATTTCAAATTACC  
41 K C Q E K L S A H P S V N S A H L S V N K E E  
121 AATGCCAAGAAAACTCTCAGCACATCCTTCTGTTAATTCAGCACATCTTTCTGTAATAAAGAGAGAA  
64 K V N V C D S P L D I A T Q L L L S N V K K L  
190 AAGTCAATGTTTGGGATAGTCCGTTAGATATTGCAACACAACCTGTTACTTTCCAACGTAAAAAATTA  
87 V L S D S E K N T L K N K W K L L T E K K S E  
259 GTACTTTCTGACTCGGAAAAAACAACGTTAAAAAATAAATGGAAATTGCTCACTGAGAAGAAATCTGAA  
110 N A E V R A V A L V P K D F P K D L V L A P L  
328 AATGCCGAGGTAAGAGCGGTGCGCCCTTGTACCAAAGATTTTCCCAAGATCTGGTTTATAGCGCCTTA  
133 P D H V N D F T W Y K K R K K R L G I K P E E  
397 CCTGATCATGTTAATGATTTTACATGGTACAAAAGCGAAAGAAAGACTTGGCATAAACCTGAACAT  
156 Q H V G L S I I V T T F N R P A I L S I T L A  
466 CAACATGTTGGTCTTTCTATTATCGTTACACATTCATTCGACCAGCAATTTATCGATTACATTAGCC  
179 C L V N Q K T H Y P F E V I V I D D G S Q E D  
535 TGTTTAGTAAACCAAAAACACATTACCCGTTTGAAGTTATCGTGACAGATGATGGTAGTCAGGAAGAT  
202 L S P I I R Q Y E N K L D I R Y V R Q K D N G  
604 CTATCACCGATCATTOGCCAATATGAAAATAAATTGGATATTCGCTACGTCAGACAAAAGATAACGGT  
225 F Q A S A A R N M G L R L A K Y D F I G L L D  
673 TTTCAAGCCAGTGGCGCTCGGAATATGGGATTACGCTTAGCAAAATATGACTTTATTGGCTTACTCGAC  
248 C D M A P N P L W V H S Y V A E L L E D D D L  
742 TGTGATATGGCGCCAAATOCATTATGGGTTTATTCTTATGTTGCAGAGCTATTAGAAGATGATGATTA  
271 T I I G P R K Y I D T Q H I D P K D F L N N A  
811 ACAATCATTGGTCCAGAAAATACATCGATACACAACATATTGACCCAAAAGACTTCTTAATAACGCG  
294 S L L E S L P E V K T N N S V A A K G E G T V  
880 AGTTTGCTTGAATCATTACCAGAAGTCAAAACCAATAATAGTGTGCGCAAAAGGGAAGGAACAGTT  
317 S L D W R L E Q F E K T E N L R L S D S P F R  
949 TCTCTGGATTGGCGCTTAGAACAATTCGAAAAACAGAAAATCTCGGCTTATCCGATTCCGCTTTCCGT  
340 F F A A G N V A F A K K W L N K S G F F D E E  
1018 TTTTGTGCGGCGGTAATGTTGCTTTCGCTAAAAATGGCTAATAAATCCGCTTCTTTGATGAGGAA

SEQUENCE ID NO.19  
(Page 1 of 3)

---

17

363 F N H W G G E D V F P G Y R L F R Y G S F F K  
1087 TTTAATCACTGGGGTGGAGAAAGATGTGGAATTTGGATATCGCTTATTCCGTTACGGTAGTTTCTTTAAA  
386 T I D G I M A Y H Q E P P G K E N E T D R E A  
1156 ACTATTGATGGCATTATGGCCTACCATCAAGAGCCACCAGGTAAAGAAAATGAAACCGATCGTGAAGCG  
409 G K N I T L D I M R E K V P Y I Y R K L L P I  
1225 GGAAAAATATTACGCTCGATATTATGAGAGAAAAGGTCCCTTATATCTATAGAAAACTTTACCAATA  
432 E D S H I N R V P L V S I Y I P A Y N C A N Y  
1294 GAAGATTTCGCATATCAATAGAGTACCTTTAGTTTCAATTTATATCCCAGCTTATAACTGTGCAAACTAT  
455 I Q R C V D S A L N Q T V V D L E V C I C N D  
1363 ATTCAACGTTGCGTAGATAGTGCACCTGAATCAGACTGTTGTTGATCTCGAGGTTTGTATTTGTAACGAT  
478 G S T D N T L E V I N K L Y G N N P R V R I M  
1432 GGTTCACAGATAATACCTTAGAAGTGATCAATAAGCTTTATGGTAATAATCCTAGGGTACGCATCATG  
501 S K P N G G I A S A S N A A V S F A K G Y Y I  
1501 TCTAAACCAAATGGCGGAATAGCCTCAGCATCAAATGCAGCCGTTTCTTTTGCTAAAGGTTATTACATT  
524 G Q L D S D D Y L E P D A V E L C L K E F L K  
1570 GGGCAGTTAGATTAGATGATTATCTTGAGCCTGATGCAGTTGAACCTGTGTTTAAAGAATTTTAAAA  
547 D K T L A C V Y T T N R N V N P D G S L I A N  
1639 GATAAAACGCTAGCTTGTGTTTATACCACTAATAGAAACGTCAATCCGGATGGTAGCTTAATCGCTAAT  
570 G Y N W P E F S R E K L T T A M I A H H F R M  
1708 GGTTCACAATTGGCCAGAATTTTCACGAGAAAACTCACACGGCTATGATTGCTCACCACCTTTAGAATG  
593 F T I R A W H L T D G F N E K I E N A V D Y D  
1777 TTCACGATTAGAGCTTGGCATTAACTGATGGATTCAATGAAAAAATTGAAAATGCCGTAGACTATGAC  
616 M F L K L S E V G K F K H L N K I C Y N R V L  
1846 ATGTTCTCAAACTCAGTGAAGTTGGAAAATTTAAACATCTTAATAAAATCTGCTATAACCGTGTATTA  
639 H G D N T S I K K L G I Q K K N H F V V V N Q  
1915 CATGGTGATAACACATCAATTAAGAACTTGGCATTCAAAAGAAAAACCATTTTGTGTAGTCAATCAG  
662 S L N R Q G I T Y Y N Y D E F D D L D E S R K  
1984 TCATTAAATAGACAAGGCATAACTTATTATAATTATGACGAATTTGATGATTAGATGAAAGTAGAAAG  
685 Y I F N K T A E Y Q E E I D I L K D I K I I Q  
2053 TATATTTTCAATAAAAACCGCTGAATATCAAGAAGAGATTGATATCTTAAAGATATTAAATCATCCAG  
708 N K D A K I A V S I F Y P N T L N G L V K K L  
2122 AATAAAGATGCCAAAATCGCAGTCAGTATTTTTATCCCAATACATTAAACGGCTTAGTGAAAAACTA  
731 N N I I E Y N K N I F V I V L H V D K N H L T  
2191 AACAATATTATTGAATATAATAAAATATATCGTTATTGTTCTACATGTTGATAAGAATCATCTTACA  
754 P D I K K E I L A F Y H K H Q V N I L L N N D  
2260 CCAGATATCAAAAAGAAATACTAGCCTTCTATCATAACATCAAGTGAATATTTTACTAAATAATGAT

SEQUENCE ID NO.19

(Page 2 of 3)

---

5

---

8 / 8

777 I S Y Y T S N R L I K T E A H L S N I N K L S.  
2329 ATCTCATATTACACGAGTAATAGATTAAATAAAACTGAGGCGCATTTAAGTAATATTAAATAAATTAAAGT  
800 Q L N L N C E Y I I F D N H D S L F V K N D S  
2398 CAGTTAAATCTAAATTGTGAATACATCATTTTTTGATAATCATGACAGCCTATTTCGTTAAAAATGACAGC  
823 Y A Y M K K Y D V G M N F S A L T H D W I E K  
2467 TATGCTTATATGAAAAATATGATGTGCGCATGAATTTCTCAGCATTAAACACATGATTGGATCGAGAAA  
846 I N A H P P F K K L I K T Y F N D N D L K S M  
2536 ATCAATGCGCATCCACCATTAAAAAGCTCATTAAACTTATTTTAATGACAATGACTTAAAAAGTATG  
869 N V K G A S Q G M F M T Y A L A H E L L T I I  
2605 AATGTGAAAGGGGCATCACAAGGTATGTTTATGACGTATGCGCTAGCGCATGAGCTTCTGACGATTATT  
892 K E V I T S C Q S I D S V P E Y N T E D I W F  
2674 AAAGAAGTCATCACATCTTGCCAGTCAATTGATAGTGTGCCAGAATATAACACTGAGGATATTTGGTTC  
915 Q F A L L I L E K K T G H V F N K T S T L T Y  
2743 CAATTTGCACTTTTAACTTTAGAAAAGAAAACCGGCCATGTATTTAATAAAACATGACCCCTGACTTAT  
938 M P W E R K L Q W T N E Q I E S A K R G E N I  
2812 ATGCCTTGGGAACGAAAATTACAATGGACAAATGAACAAATTGAAAGTGCAAAAAGAGGAGAAAATATA  
961 P V N K F I I N S I T L \*  
2881 CCTGTAAACAAGTTCATTATTAAATAGTATAACTCTATAA

SEQUENCE ID NO.19  
(Page 3 of 3)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

---

S

---





10089/000028/SWAI01

File 351:Derwent WPI 1963-2006/UD,UM &UP=200625  
(c) 2006 Thomson Derwent

Set Items Description  
S1 1 PN=JP 2001521741  
?

T S1/5

1/5/1  
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2006 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012531380

WPI Acc No: 1999-337486/199928

Related WPI Acc No: 2000-013032; 2000-376319; 2003-066235; 2003-093126;  
2003-129159; 2003-482708; 2003-532558; 2003-755179; 2003-787045;  
2003-787059; 2004-375496; 2004-709095; 2005-417007; 2005-532469;  
2006-010611; 2006-018932; 2006-065757

XRAM Acc No: C99-099223

Nucleic acid encoding hyaluronate synthase for production of hyaluronic acid with controlled molecular weight and targeting specificity

Patent Assignee: UNIV OKLAHOMA (UYOK-N); UNIV OKLAHOMA STATE (OKLA ); UNIV OKLAHOMA (OKLA ); DEANGELIS P (DEAN-I); KUMARI K (KUMA-I); WEIGEL P H (WEIG-I); DEANGELIS P L (DEAN-I)

Inventor: DEANGELIS P; KUMARI K; WEIGEL P H; WEIGEL H; DEANGELIS P L

Number of Countries: 084 Number of Patents: 023

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9923227	A2	19990514	WO 98US23153	A	19981030	199928 B
AU 9913706	A	19990524	AU 9913706	A	19981030	199940
EP 1025211	A2	20000809	EP 98957450	A	19981030	200039
			WO 98US23153	A	19981030	
CN 1283224	A	20010207	CN 98812773	A	19981030	200129
BR 9814834	A	20010717	BR 9814834	A	19981030	200146
			WO 98US23153	A	19981030	
KR 2001031682	A	20010416	KR 2000704743	A	20000501	200163
JP 2001521741	W	20011113	WO 98US23153	A	19981030	200204
			JP 2000519083	A	19981030	
MX 2000004182	A1	20010901	MX 20004182	A	20000428	200239
US 20020160489	A1	20021031	US 97899040	A	19970723	200274
			US 9764435	P	19971031	
			US 99469200	A	19991221	
			US 2001879959	A	20010912	
US 20030073221	A1	20030417	US 9764435	P	19971031	200329
			US 98178851	A	19981026	
			US 99469200	A	19991221	
			US 200111768	A	20011211	
US 20030082780	A1	20030501	US 94270581	A	19940701	200331
			US 9764435	P	19971031	
			US 98146893	A	19980903	
			US 98178851	A	19981026	

			US 99469200	A	19991221	
			US 200111771	A	20011211	
AU 762036	B	20030619	AU 9913706	A	19981030	200351
AU 2003248204	A1	20031030	AU 2003248204	A	20030919	200431
EP 1025211	B1	20041215	EP 98957450	A	19981030	200482
			WO 98US23153	A	19981030	
US 6833264	B1	20041221	US 9764435	P	19971031	200501
			US 98178851	A	19981026	
			US 99469200	A	19991221	
DE 69828193	E	20050120	DE 98628193	A	19981030	200510
			EP 98957450	A	19981030	
			WO 98US23153	A	19981030	
EP 1522579	A2	20050413	EP 98957450	A	19981030	200525
			EP 200429227	A	19981030	
ES 2235378	T3	20050701	EP 98957450	A	19981030	200545
US 20050202540	A1	20050915	US 94270581	A	19940701	200561
			US 9764435	P	19971031	
			US 98146893	A	19980903	
			US 98178851	A	19981026	
			US 99469200	A	19991221	
			US 200111768	A	20011211	
			US 2005109855	A	20050420	
DE 69828193	T2	20051201	DE 98628193	A	19981030	200579
			EP 98957450	A	19981030	
			WO 98US23153	A	19981030	
US 20060013829	A1	20060119	US 94270581	A	19940701	200607
			US 9764435	P	19971031	
			US 98146893	A	19980903	
			US 98178851	A	19981026	
			US 99469200	A	19991221	
			US 200111771	A	20011211	
			US 2005226480	A	20050914	
US 20060018924	A1	20060126	US 94270581	A	19940701	200609
			US 9764435	P	19971031	
			US 98146893	A	19980903	
			US 98178851	A	19981026	
			US 99469200	A	19991221	
			US 200111771	A	20011211	
			US 2005228079	A	20050916	
US 6991921	B2	20060131	US 94270581	A	19940701	200610
			US 9764435	P	19971031	
			US 98146893	A	19980903	
			US 98178851	A	19981026	
			US 99469200	A	19991221	
			US 200111768	A	20011211	

Priority Applications (No Type Date): US 98178851 A 19981026; US 9764435 P 19971031; US 97899040 A 19970723; US 99469200 A 19991221; US 2001879959 A 20010912; US 200111768 A 20011211; US 94270581 A 19940701; US 98146893 A 19980903; US 200111771 A 20011211; US 2005109855 A 20050420; US 2005226480 A 20050914; US 2005228079 A 20050916

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9923227 A2 E 125 C12N-015/54

Designated States (National): AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ

TM TR TT UA UG UZ VN YU ZW  
 Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR  
 IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SZ UC ZW  
 AU 9913706 A Based on patent WO 9923227  
 EP 1025211 A2 E C12N-009/10 Based on patent WO 9923227  
 Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI  
 LU MC NL PT SE  
 CN 1283224 A C12N-009/10  
 BR 9814834 A Based on patent WO 9923227  
 KR 2001031682 A C12N-015/54  
 JP 2001521741 W 104 C12N-015/09 Based on patent WO 9923227  
 MX 2000004182 A1 A61K-031/715  
 US 20020160489 A1 C12N-009/26 CIP of application US 97899040  
 Provisional application US 9764435  
 Cont of application US 99469200  
 US 20030073221 A1 C12N-009/26 Provisional application US 9764435  
 Cont of application US 98178851  
 Cont of application US 99469200  
 US 20030082780 A1 C12N-009/26 Cont of application US 94270581  
 Provisional application US 9764435  
 CIP of application US 98146893  
 Cont of application US 98178851  
 Cont of application US 99469200  
 CIP of patent US 6455304  
 AU 762036 B C12N-015/54 Previous Publ. patent AU 9913706  
 Based on patent WO 9923227  
 AU 2003248204 A1 C12N-015/54 Div ex patent AU 762036  
 EP 1025211 B1 E C12N-009/10 Based on patent WO 9923227  
 Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI  
 LU MC NL PT SE  
 US 6833264 B1 C12N-001/21 Provisional application US 9764435  
 Cont of application US 98178851  
 DE 69828193 E C12N-009/10 Based on patent EP 1025211  
 Based on patent WO 9923227  
 EP 1522579 A2 E C12N-009/10 Div ex application EP 98957450  
 Div ex patent EP 1025211  
 Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI  
 LU MC NL PT SE  
 ES 2235378 T3 C12N-009/10 Based on patent EP 1025211  
 US 20050202540 A1 C12P-019/28 Cont of application US 94270581  
 Provisional application US 9764435  
 CIP of application US 98146893  
 Cont of application US 98178851  
 Cont of application US 99469200  
 Cont of application US 200111768  
 CIP of patent US 6455304  
 Cont of patent US 6833264  
 DE 69828193 T2 C12N-009/10 Based on patent EP 1025211  
 Based on patent WO 9923227  
 US 20060013829 A1 C07H-021/00 Cont of application US 94270581  
 Provisional application US 9764435  
 CIP of application US 98146893  
 Cont of application US 98178851  
 Cont of application US 99469200  
 Cont of application US 200111771  
 CIP of patent US 6455304

US 20060018924 A1	C07H-021/00	Cont of patent US 6833264 Cont of application US 94270581 Provisional application US 9764435 CIP of application US 98146893 Cont of application US 98178851 Cont of application US 99469200 Cont of application US 200111771 CIP of patent US 6455304 Cont of patent US 6833264
US 6991921 B2	C12P-019/00	Cont of application US 94270581 Provisional application US 9764435 CIP of application US 98146893 Cont of application US 98178851 Cont of application US 99469200 CIP of patent US 6455304 Cont of patent US 6833264

Abstract (Basic): WO 9923227 A2

NOVELTY - Purified nucleic acid (I) having a region that encodes enzymatically active hyaluronate synthase (HS), is new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (a) recombinant vector (plasmid, cosmid, phage or virus) containing (I);
- (b) recombinant prokaryotic or eukaryotic host cells containing this vector or (I);
- (c) purified HS polypeptide;
- (d) production of hyaluronic acid (HA) by culturing host organisms transduced with (I) and also containing sequences encoding enzymes that produce uridine diphosphate (UDP)-N-acetylglucosamine (GlcNAc) and UDP-glucuronic acid (GlcA);
- (e) pharmaceutical composition containing a drug and HA produced by HS; and
- (f) PCR probes, (1)-(4), that hybridize to the HS-encoding sequence from *Streptococcus equisimilis*.

ACTIVITY - Angiogenic; anti-arthritic.

MECHANISM OF ACTION - None given.

USE - (I), or its fragments, are used:

- (i) in hybridization assays to detect DNA or the mRNA encoding *Streptococcus equisimilis* HS, particularly to identify HA-producing bacteria; and

- (ii) to produce hyaluronic acid (HA), particularly with modified structure or molecular size, in transformed cells (claimed).

High molecular weight HA is useful e.g. in cosmetics (moisture retainer), in eye surgery (replacement for vitreous fluid), for treating arthritis (by direct intra-articular injection) and as a lubricant in shaving cream. Low molecular weight HA is useful for angiogenesis and wound healing, also to stabilize recombinant human proteins being used therapeutically (to prevent their rapid clearance).

HA can also be used to target an attached protein or drug to the reticuloendothelial system (which has endocytic receptors for HA).

ADVANTAGE - Hyaluronic acid produced by HS has modified molecular weight such that it evades an immune response and/or can target specific tissue or cell types (claimed). HA produced this way is purer than that produced conventionally from rooster combs or streptococcal culture media.

pp; 125 DwgNo 0/14

Title Terms: NUCLEIC; ACID; ENCODE; HYALURONATE; SYNTHASE; PRODUCE;  
HYALURONIC; ACID; CONTROL; MOLECULAR; WEIGHT; SPECIFIC

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-031/715; C07H-021/00; C07H-021/04;  
C12N-001/21; C12N-009/10; C12N-009/26; C12N-015/09; C12N-015/54;  
C12P-019/00; C12P-019/26; C12P-019/28

International Patent Class (Additional): A61K-031/728; A61K-039/02;  
A61P-043/00; C08B-037/00; C12N-005/06; C12N-007/00; C12N-009/24;  
C12N-015/70; C12N-015/74; C12N-015/75; C12N-015/86; C12P-019/04;  
C12P-021/00; C12P-021/02; C12P-021/06; C12Q-001/68; C12N-015/09;  
C12R-001-46

File Segment: CPI

?

21apr06 14:06:27 User206065 Session D5445.3

Sub account: 10089/000028/SWAI01

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-521741

(P2001-521741A)

(43) 公表日 平成13年11月13日 (2001. 11. 13)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 31/728	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/728		A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 B 0 5 0
A 6 1 P 43/00	1 1 1	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/21		9/10	4 B 0 6 4
9/10		C 1 2 P 19/04	C 4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 104 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-519083(P2000-519083)  
 (86) (22) 出願日 平成10年10月30日 (1998. 10. 30)  
 (85) 翻訳文提出日 平成12年5月1日 (2000. 5. 1)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US98/23153  
 (87) 国際公開番号 WO99/23227  
 (87) 国際公開日 平成11年5月14日 (1999. 5. 14)  
 (31) 優先権主張番号 60/064, 435  
 (32) 優先日 平成9年10月31日 (1997. 10. 31)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 09/178, 851  
 (32) 優先日 平成10年10月26日 (1998. 10. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ザ ボード オブ リージェンツ オブ  
 ザ ユニバーシティー オブ オクラホマ  
 THE BOARD OF REGENT  
 S OF THE UNIVERSITY  
 OF OKLAHOMA  
 アメリカ合衆国, 73019 オクラホマ, ノ  
 ーマン, アスブ アヴェニュー 1000  
 (72) 発明者 ウェイジェル, ボウル, エイッチ,  
 アメリカ合衆国, 73003 オクラホマ州,  
 エドモンド, ハロウデイル 817  
 (74) 代理人 弁理士 石川 泰男 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロナンシンターゼ遺伝子およびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、酵素活性を有するストレプトコッカス エキシミリスのヒアルロネートシンターゼ(seHAS)をコードするコード領域セグメントを有する核酸セグメント、およびヒアルロネートシンターゼを産生する組換え細胞の調製におけるこの核酸セグメントの使用、およびそのヒアルロン酸産物に関するものである。ヒアルロンネートは、ヒアルロン酸もしくはヒアルロナンとしても知られている。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵素活性ヒアルロネートシンターゼをコードするコード領域を含む精製された核酸セグメント。

【請求項2】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号2に示すストレプトコッカス エクイシミリスのヒアルロネートシンターゼをコードする請求項1記載の精製された核酸セグメント。

【請求項3】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号1による核酸配列を含む請求項1記載の精製された核酸セグメント。

【請求項4】 酵素活性ヒアルロネートシンターゼをコードするコード領域を含む精製された核酸セグメントであって、前記精製された核酸セグメントが、配列番号1の核酸配列とハイブリダイズすることが可能である核酸セグメント。

【請求項5】 酵素活性ヒアルロネートシンターゼをコードするコード領域を含む精製された核酸セグメントであって、配列番号1のヌクレオチド配列と比較した場合、前記精製された核酸セグメントが、準保存された、もしくは保存されたアミノコドン酸の変化を有する核酸セグメント。

【請求項6】 プラスミド、コスミド、ファージ、もしくはウィルスベクターからなる群から選択される組換えベクターであって、前記組換えベクターが酵素活性ヒアルロナンシンターゼをコードするコード領域を有する精製された核酸セグメントを含む組換えベクター。

【請求項7】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号2に示すストレプトコッカス エクイシミリスのヒアルロナンシンターゼをコードする請求項6記載の組換えベクター。

【請求項8】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号1による核酸配列を含む請求項6記載の組換えベクター。

【請求項9】 前記プラスミドがさらに発現ベクターを有する請求項6記載の組換えベクター。

【請求項10】 前記発現ベクターが、酵素活性ストレプトコッカス エクイシミリスのヒアルロナンシンターゼのコード領域と機能的に結合したプロモータを含む請求項9記載の組換えベクター。

【請求項11】 酵素活性ヒアルロナンシンターゼをコードするコード領域を有する精製された核酸セグメントを含有する組換えベクターで形質転換された原核細胞である組換え宿主細胞。

【請求項12】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号2に示すストレプトコッカス エクイシミリスのヒアルロナンシンターゼをコードする請求項11記載の組換え宿主細胞。

【請求項13】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号1による核酸配列を含む請求項11記載の組換え宿主細胞。

【請求項14】 前記宿主細胞がヒアルロン酸を産生する請求項13記載の組換え宿主細胞。

【請求項15】 前記酵素活性ヒアルロナンシンターゼが、修飾された構造を有するヒアルロン酸重合体を産生することができる請求項11記載の組換え宿主細胞。

【請求項16】 前記酵素活性ヒアルロナンシンターゼが、変更されたサイズ分布を有するヒアルロン酸重合体を産生することができる請求項11記載の組換え宿主細胞。

【請求項17】 酵素活性ヒアルロナンシンターゼをコードするコード領域を有する精製された核酸セグメントを含有する組換えベクターで形質転換された真核性の細胞である組換え宿主細胞。

【請求項18】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号2に示すストレプトコッカス エクイシミリスのヒアルロナンシンターゼをコードする請求項17記載の組換え宿主細胞。

【請求項19】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号1による核酸配列を含む請求項17記載の組換え宿主細胞。

【請求項20】 前記宿主細胞がヒアルロン酸を産生する請求項19記載の組換え宿主細胞。

【請求項21】 前記酵素活性ヒアルロナンシンターゼが、修飾された構造を有するヒアルロン酸重合体を産生することができる請求項17記載の組換え宿主細胞。



【請求項22】 前記酵素活性ヒアルロナンシンターゼが、変更されたサイズ分布を有するヒアルロン酸重合体を産生することができる請求項17記載の組換え宿主細胞。

【請求項23】 組換え宿主細胞内に組換えベクターを導入するためにエレクトロポレーションされた組換え宿主細胞であって、前記組換えベクターが酵素活性ヒアルロナンシンターゼをコードするコード領域を有する精製された核酸セグメントを含有する組換えベクターである組換え宿主細胞。

【請求項24】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号2に示すストレプトコッカス エクイシミリスのヒアルロナンシンターゼをコードする請求項23記載の組換え宿主細胞。

【請求項25】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号1による核酸配列を含む請求項23記載の組換え宿主細胞。

【請求項26】 前記宿主細胞がヒアルロン酸を産生する請求項25記載の組換え宿主細胞。

【請求項27】 前記酵素活性ヒアルロナンシンターゼが、修飾された構造を有するヒアルロン酸重合体を産生することができる請求項23記載の組換え宿主細胞。

【請求項28】 前記酵素活性ストレプトコッカス エクイシミリスヒアルロナンシンターゼが、変更されたサイズ分布を有するヒアルロン酸重合体を産生することができる請求項23記載の組換え宿主細胞。

【請求項29】 酵素活性ストレプトコッカス エクイシミリスヒアルロナンシンターゼをコードするコード領域を有する精製された核酸セグメントを含有する組換えベクターが導入された組換え宿主細胞。

【請求項30】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号2に示すストレプトコッカス エクイシミリスのヒアルロナンシンターゼをコードする請求項29記載の組換え宿主細胞。

【請求項31】 前記精製された核酸セグメントが、配列番号1による核酸配列を含む請求項29記載の組換え宿主細胞。

【請求項32】 前記宿主細胞がヒアルロン酸を産生する請求項31記載の

組換え宿主細胞。

【請求項33】 前記酵素活性ヒアルロナンシンターゼが、修飾された構造を有するヒアルロン酸重合体を産生することができる請求項29記載の組換え宿主細胞。

【請求項34】 前記酵素活性ヒアルロナンシンターゼが、変更されたサイズ分布を有するヒアルロン酸重合体を産生することができる請求項29記載の組換え宿主細胞。

【請求項35】 酵素活性ヒアルロナンシンターゼポリペプチドを含有する精製された組成物。

【請求項36】 配列番号2によるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含有する精製された組成物。

【請求項37】 DNA試料を入手する工程、  
配列番号1による精製された核酸配列と前記DNA試料とを接触させる工程、  
前記DNA試料と前記精製された核酸セグメントをハイブリダイズし、それによりハイブリダイズされた複合物を形成する工程、および  
複合物を検出する工程  
を含むDNA種を検出する方法。

【請求項38】 細菌細胞試料を入手する工程、  
配列番号1による精製された核酸セグメントと、前記細菌細胞試料からの少なくとも一つの核酸を接触させる工程、  
前記少なくとも一つの核酸と前記精製された核酸セグメントとをハイブリダイズし、それによりハイブリダイズされた複合物を形成する工程、および  
ハイブリダイズされた複合物を検出する工程  
を含有し、  
ハイブリダイズされた複合物の存在が、ストレプトコッカス エクイシミリスのヒアルロナンシンターゼをコードするmRNAを発現する細菌種を示している  
ストレプトコッカス エクイシミリスのヒアルロナンシンターゼをコードするmRNAを発現する細菌細胞を検出する方法。

【請求項39】 宿主生物内に酵素活性ヒアルロナンシンターゼをコードす

るコード領域を有する精製された核酸セグメントを導入する工程であって、前記宿主生物がUDP-GlcNAcおよびUDP-GlcAを産生する酵素をコードする核酸セグメントを含有する工程、

ヒアルロン酸を分泌させるために、培地で宿主生物を培養する工程、および分泌されたヒアルロン酸を回収する工程を含むヒアルロン酸を産生する方法。

【請求項40】 前記ヒアルロン酸を回収する工程が、培地から分泌されたヒアルロン酸を抽出することを含む請求項39記載の方法。

【請求項41】 さらに抽出されたヒアルロン酸を精製する工程を含む請求項40記載の方法。

【請求項42】 前記宿主生物を培養する工程において、前記宿主細胞が構造的に修飾されたヒアルロン酸を分泌する請求項39記載の方法。

【請求項43】 前記宿主生物を培養する工程において、前記宿主細胞が変更されたサイズを有するヒアルロン酸を分泌する請求項39記載の方法。

【請求項44】 予め選択された医薬品と、ヒアルロナンシンターゼにより産生されたヒアルロン酸の有効量を含有する医薬組成物。

【請求項45】 前記ヒアルロン酸が、配列番号2のストレプトコッカスエクイシミリスのヒアルロナンシンターゼにより産生された請求項44の医薬品組成物。

【請求項46】 前記ヒアルロン酸の分子量が変更され、それにより免疫応答を避けることができる変更された分子量の医薬品組成物を産生する請求項44記載の医薬品組成物。

【請求項47】 前記ヒアルロン酸の分子量が変更され、それにより変更された分子量の医薬品組成物に生体親和性を有する患者内で、特異的な組織もしくは細胞型を標的とすることができる変更された分子量の医薬品組成物を産生する請求項44記載の医薬品組成物。

【請求項48】 酵素活性ヒアルロナンシンターゼをコードする精製され単離された核酸配列であって、

( a ) 配列番号1による核酸配列

- (b) 配列番号1による核酸配列と相補する核酸配列
- (c) 配列番号1による核酸とハイブリダイズする核酸配列
- (d) 配列番号1の相補する核酸配列とハイブリダイズする核酸配列、および
- (e) 配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6のPCRプローブからなる群から選択されるPCRプローブとハイブリダイズする核酸配列からなる群から選択される核酸配列。

【請求項49】 酵素活性ヒアルロナンシンターゼをコードする核酸セグメントから実質的に構成される精製され単離された核酸配列。

【請求項50】 宿主細胞でヒアルロン酸を発現することが可能な方法により、請求項1、2もしくは3による単離された核酸セグメントを形質転換もしくは移入させた原核性もしくは真核性宿主細胞。

【請求項51】 配列番号1による核酸配列の核酸セグメントの十分な複製物を有するヒアルロナンシンターゼをコードする核酸セグメントから実質的になり、ストレプトコッカス エクイシミリスのヒアルロナンシンターゼのためにコードされた生物学的特性を有することができる単離された核酸配列。

【請求項52】 請求項51に記載のcDNA配列。

【請求項53】 宿主細胞でヒアルロン酸を発現することが可能な方法により、請求項51による核酸セグメントを形質転換もしくは移入させた原核性もしくは真核性宿主細胞

【請求項54】 酵素活性ヒアルロナンシンターゼをコードするコード領域を有する精製された核酸セグメントであって、配列番号1によるヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができる精製された核酸セグメント。

【請求項55】 配列番号1とハイブリダイズすることができる配列番号3による精製された核酸セグメント。

【請求項56】 配列番号1とハイブリダイズすることができる配列番号4による精製された核酸セグメント。

【請求項57】 配列番号1とハイブリダイズすることができる配列番号5による精製された核酸セグメント。

【請求項58】 配列番号1とハイブリダイズすることができる配列番号6

による精製された核酸セグメント。

【請求項59】 酵素活性ヒアルロネートシンターゼをコードするコード領域を有する精製された核酸セグメントであって、

(A) 配列番号2による核酸セグメント、

(B) 配列番号1によるヌクレオチド配列、

(C) (A) および (B) で定義された核酸セグメントとハイブリダイズする核酸セグメントもしくはそのフラグメント、および

(D) 遺伝子コードの縮退がなければ、(A)、(B)、および(C)で定義される核酸セグメントとハイブリダイズし、もしくは機能的に同等のアミノ酸をコードする核酸セグメント、

からなる群から選択される精製された核酸セグメント。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 発明の背景

## 1. 発明の技術分野

本発明は、酵素として活性のストレプトコッカス（連鎖球菌属）エクイシミリ（*Streptococcus equisimilis*）のヒアルロン酸シンターゼ（scHAS）をコード化するコード領域セグメントを含む核酸セグメント、およびヒアルロネートシンターゼおよびヒアルロン酸生成物を産生する組換え細胞を調製する際にこの核酸セグメントを使用することに関するものである。ヒアルロネートは、ヒアルロン酸またはヒアルロナンとしても知られている。

## 【0002】

## 2. 関連技術の簡単な説明

連鎖球菌感染の発生は、世界的に、特に発展途上国において主要な健康および経済問題である。この理由の一つは、連鎖球菌属の細菌が、体の貪食細胞、即ちマクロファージおよび多形核細胞（PMN）によって検出されることなく成長する能力にある。これらの細胞は、外来の微生物を認識し、包囲する役割を担っている。この細菌が検出を回避するのに有効な方法の一つは、多糖類のカプセル、例えばヒアルロン酸（HA）カプセルによって細菌自身を被覆することによってある。HAの構造は、原核および真核細胞において同一である。HAは一般的には免疫原性ではないので、カプセル化された細菌は免疫応答を引き起こさず、従って破壊の標的とはならない。更に、このカプセルはPMNに対してインビトロで抗貪食作用をもたらし、連鎖球菌がマクロファージに付着するのを阻害する。まさにこのために、A属およびC属の連鎖球菌においては、IIAカプセルは天然および実験的な感染に際して主要な病原性の因子となる。A属の連鎖球菌は、咽頭炎、膿瘍、深い組織感染、リウマチ熱および毒性のショック状症候群を含む多数のヒト疾患の原因となっている。C属のストレプトコッカス エクイシミスは、骨髓炎、咽頭炎、脳腫瘍および肺炎の原因となっている。

## 【0003】

構造的には、HAは、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）およびグルクロン

酸 (GlcA) からなる二糖類の単位を反復してなる高分子量の直鎖状多糖類である。HA分子中の二糖類の反復数が30,000を越え、 $M_r > 10^7$ となることがある。HAは、哺乳類細胞と細菌細胞（特にA属およびC属の連鎖球菌およびA型のパスツレラ・ムルトシダ (*Pasturella Multocida*) との双方によって合成される唯一のグリコサミノグリカンである。これらの菌株が産生するHAは、HAカプセルだけでなく培地中へも分泌される。これらの細菌がHAを合成する機構は広範な医学的興味の対象となっている。なぜなら、HAカプセルの産生は、連鎖球菌が免疫系の検閲を逃れるために用いる非常に効率的かつ賢明な方法だからである。

#### 【0004】

HAは、哺乳類および細菌細胞によって、その細胞膜に局在化した酵素ヒアルロネートシンターゼによって合成される。これらの微生物中のHAの合成は多段階のプロセスであると考えられる。開始段階は、初期前駆体であるUDP-GlcNAcまたはUDP-GlcAの結合が関与する。これに続く伸長では、成長中のオリゴ糖鎖への二種類の糖類の交互付加が関与する。この成長中の重合体は、細胞の細胞膜領域を横断し、細胞外空間へと伸長する。HAの生合成系は、最初に研究された膜ヘテロ多糖類合成経路の一つであるけれども、HAの合成機構はいまだ良く理解されていない。これは、現在までに開発されたインビトロ系が、HAのデノボ生合成が達成されていないという点で不十分だからである。

#### 【0005】

HA重合体が成長する方向は、本分野において通常の知識を有するものの間でいまだ意見が一致しない事項である。単糖類は、成長中のHA鎖の還元または非還元末端へと付加できる。更に、(i) 新生短鎖がタンパク質へと、UDPへと、あるいは脂質中間体へと共有結合によって連結されているかどうか、(ii) 鎖がプライマーを用いて開始されているかどうか、および(iii) 成熟した重合体が、連鎖球菌の細胞膜を通して伸長しているかどうかについて、問題が残っている。HAの生合成の機構を理解することによって、このプロセスに干渉することで、連鎖球菌およびパスツレラ感染を制御するための他の戦略の開発が可能となるかもしれない。

## 【0006】

HAは、脊椎動物のほとんどすべての組織中で同定されており、種々の臨床用途において広範に使用されており、最も注目すべき適切な用途は関節内マトリックス補剤および眼科手術である。また、化学文献の示すところによれば、当初の認識ではHAは主として幾つかの結合組織のマトリックス中および特定株の細菌のカプセル中の受動的な構造成分であったが、この到るところに存在する高分子が多くの生物プロセス（胚形成の間の細胞の遊走および分化調節から、細胞外マトリックスの機構および代謝の調節まで、および転移、傷の治癒および炎症の複雑なプロセスにおける重要な役割まで）に動的に関与しているという認識へと移行している。更に、HAが高度に代謝活性であり、細胞がその合成および分解のプロセスに対して一層注意を払っていることが明らかになり始めている。例えば、組織中のHAの半減期は、軟骨における1-3週間から表皮における1日未満まで変動する。

## 【0007】

現在明らかなように、一種類のタンパク質が両方の糖基質を利用してHAを合成している。HAシンターゼの略号であるHASは、この類の酵素を指示するものとして広範囲の支持を得ている。マルコヴィッチ他は、ストレプトコッカスピオジェネスから得たHASの活性を特徴付けることに成功し、この酵素の膜への局在化と、糖ヌクレオチド前駆体および $Mg^{2+}$ への要求を発見した。プレムは、B6細胞によって産生された伸長中のHAが、培地に添加されたヒアルロニダーゼによって消化されることを発見し、HASが細胞膜に存在することを提案した。また、フィリップソンとシュワルツは、HASの活性が、マウスオリゴデンドログリオーマ細胞中の膜マーカーと共に分画されていることを発見した。

## 【0008】

グリコサミノグリカン合成が進行するにつれて、HASは、高いMrを有するHAを組み立て、HAは同時に膜を貫通して細胞外空間へと伸長する（あるいは細菌の場合には細胞カプセルを製造する）。核酸、タンパク質および脂質は核、小胞体／ゴルジ、細胞質またはミトコンドリア中で合成されることから、この態様の生合成は高分子の間では特異である。また、成長中の鎖の細胞外空間への



伸長によって、無束縛の重合体成長が可能となり、これによって例外的に大きなサイズのHAがもたらされ、一方ゴルジまたは後ゴルジコンパートメント内での合成の束縛によって、生成する重合体の全体の量および長さは制限され得る。また、束縛された管腔内のHAの濃度が高いことによって高粘度の環境がもたらされ、これは他のオルガネラ機能に対しては有害であるかもしれない。

#### 【0009】

HAのカプセル被膜を製造する連鎖球菌の菌株から、および真核細胞から、HASを可溶化し、同定し、および精製するために幾つかの試みがなされてきた。連鎖球菌およびマウスオリゴデンドログリオーマの酵素は洗剤への溶解に成功し、研究されているけれども、活性のHASを更なる研究用に、あるいは分子クローニング用に精製する努力は、数十年にわたって不成功に終わっている。プレムおよびモーソルフは、過ヨウ素酸酸化したUDP-GlcAまたはUDP-GlcNAcを用いて、HASと同時に精製された連鎖球菌膜中の $\sim 52$  kDaのタンパク質をアフィニティー標識した。この結果、C属の連鎖球菌HASがクローニングされたと述べる報告書がもたらされたが、これは不幸にも誤っていた。この研究では、活性シンターゼの発現を示すことに失敗しており、実際にはペプチドトランスポーターをクローニングしていたかもしれない。トリスコットとファンデリジンは、ジギトニンを使用し、連鎖球菌膜からのHASを活性形で溶解した。ファンデリジンおよびドレークは、42、33および27 kDaの3種類の連鎖球菌膜タンパク質を5'-アジド-UDP-GlcAによって選択的に放射線標識し、33 kDaのタンパク質がHASであると示唆した。しかし、後に発見されたところによれば、HASは実際には42 kDaのタンパク質であることが判明した。

#### 【0010】

これらの努力にもかかわらず、HAの合成の調節および機構の理解の進歩は、実質的に止まっていた。なぜなら、HASのmRNAまたはHASタンパク質のための分子プローブが存在しなかったからである。主要なブレークスルーが1993年に起こり、このときデアンジェリス他は、タンパク質HasAをコード化するA属の連鎖球菌遺伝子の分子クローニングとキャラクター化を報告した。このタンパク質の機能は（現在はspHAS（S. ピオジェネスHAS）と

表記されているが) 未知であるけれども、この遺伝子は、部分的には細菌のHA合成に必要なオペロンからなることが知られている。次いで、spHASはHA伸長を担っていることが明らかになり、同定およびクローニングされ、次いで発現が成功した最初のグリコサミノグリカンシンターゼである。このS. ピオジェネスHA合成オペロンは、二つの他のタンパク質をコード化している。H a s BはUDP-グルコースデヒドロゲナーゼであり、これは、HA合成の基質の一つであるUDP-GlcAへとUDP-グルコースを変換するのに必要である。H a s CはUDP-グルコースピロホスホリラーゼであり、これはグルコース1-ホスフェートおよびUTPをUDP-グルコースに変換するのに必要である。h a s Aおよびh a s B遺伝子を、無被膜性の連鎖球菌株またはエンテロコッカス フェカリスのいずれかへと同時にトランスフェクションすると、これらにIIAを合成してカプセルを生成する能力が付与される。これによって、H a s AがHAシンターゼであるという最初の強力な証拠がもたらされた。

#### 【 0 0 1 1 】

この捕捉しがたいHAシンターゼ遺伝子は、最終的にはトランスポゾン変異発生アプローチによってクローニングされ、ここではHA合成オペロンのトランスポゾンによる阻止を含む無被膜性の変異群A株を生成させる。このトランスポゾンの既知の配列によって、連鎖球菌DNAに関連する領域を同定し、次いで野性型細胞からクローニングすることが可能となった。このコード化されたspHASは、酵母キチンシンターゼ属と5-10%相同であり、(原腸形成の間に発生的に発現する)ゼノプス ラエビス (*Xenopus laevis*) タンパク質DG42と30%一致する。この機能はその時点では未知であった。デアンジュリスおよびワイゲルは、大腸菌中で活性の組換えspHASを発現させ、この一つの生成された遺伝子産物が、UDP-GlcAおよびUDP-GlcNAcとインビトロでインキュベートしたときに、高いMrのIIAを合成することを示し、これによって1959年に最初に提案されたように、HA合成に必要な双方のグリコシルトランスフェラーゼ活性が同じタンパク質によって触媒されていることを示した。これによって、1996年にほとんど同時に真核細胞のHASのcDNAを4箇所の研究室で同定するという段階が開かれ、HASが相異なるイソ酵素をコード化する多遺伝子属であるこ

とが明らかになった。二種類の遺伝子 (H A S 1 および H A S 2) は哺乳類において早期に発見され (29-34)、第三の遺伝子 H A S 3 は後で発見された。第二の連鎖球菌 seHAS または ストレプトコッカス エクイシミス ヒアルロン酸シンターゼをここで発見し、本発明として請求し、本明細書に開示する。

【 0 0 1 2 】

また、上記したように、我々は C 属の ストレプトコッカス エクイシミス (seHAS) から真正な H A S 遺伝子を精製した：この seHAS タンパク質は、spHAS 酵素に対して高水準の相同性 (ほぼ 70%) を有している。しかし、この相同性は興味深い。なぜなら、seHAS 遺伝子は、spHAS 遺伝子に対して交差ハイブリダイゼーションしないからである。

【 0 0 1 3 】

組換え seHAS を発現する大腸菌から調製した膜は、双方の基質を提供したときには H A を合成する。この結果によって、C 属の H A S をクローニングしたと主張するランシング他の以前の報告が誤っていたことが確認された。不幸なことに、幾つかの研究において、このキャラクタリゼーションされていない 52 k D a の連鎖球菌タンパク質に対する抗体を使用して、真核細胞の H A S と考えられたものを研究していた。

【 0 0 1 4 】

イタノおよびキムラは、H A を合成できない変異マウスの哺乳類腫瘍細胞系中の発現クローニングを採用し、最初の推定哺乳類 H A S c D N A (mmHAS1) をクローニングした。H A 合成に欠陥があるサブクローンは、染色体細胞融合実験における H A 合成に対して相補的な三種類の別々の属に別れており、少なくとも 3 種類のタンパク質が必要であることを示唆している。これらの属のうちの 2 つは幾つかの H A 合成活性を維持しており、一方 1 つは何も示さなかった。後者の細胞系は、親細胞から調製した c D N A を用いた一時的トランスフェクション実験において使用されており、H A 合成活性を保存する単一のタンパク質を同定しようとした。配列分析が示すところによれば、予期された膜形態を有する約 65 k D a のタンパク質の推定一次構造は、spHAS の構造に類似している。mmHAS1 は spHAS に対して 30% 相同であり、D G 42 に対して 55% 相同である。この

報告書が現れたのと同じ月に、他の三つのグループが、同じマウスおよびヒト酵素であると最初は思われていたものをコード化するcDNAを記載した論文を提出した。しかし、異常な環境によって、これら4つの研究室では、双方の種中の別々のHASイソ酵素を発見していた。

【 0 0 1 5 】

イタノおよびキムラのものと同様の機能性クローニングアプローチを使用して、シジャン他は、HAS1のヒトホモログを同定した。腸間膜cDNAライブラリーを使用してマウス粘膜Tリンパ球をトランスフェクションし、次いでこれをロゼットアッセイでの付着能によってスクリーニングした。一つのトランスフェクタントの付着は、既知の細胞表面HA結合タンパク質であるCD44に対する抗血清によって阻止され、ヒアルロニダーゼによる前処理によって直接に廃棄された。従って、このトランスフェクタントによるロゼッティングには、HAの合成が必要である。これを担うcDNAのクローニングおよび配列決定によって、hsHAS1が同定された。また、イタノおよびキムラは、ヒトHAS1のcDNAをヒト胎児脳ライブラリーから分離したことを報告した。しかし、これら2つのグループから報告されたhsHAS1のcDNAは長さが異なっており、これらは578または543のアミノ酸を有するタンパク質をコード化していた。HASの活性は、この長い方の形態についてのみ示されていた。

【 0 0 1 6 】

正統的なHASインターゼとしてのspHASと、DG42、spHASおよびNodC（リゾビウム中の $\beta$ -GlcNAcトランスフェラーゼノジュレーション因子）の間の相同性の近接した領域との分子的同定に基づいて、スパイサー他は、変性RT-PCRアプローチを用いて、第二の異なる酵素をコード化するマウス胎児cDNAをクローニングし、これをmmHAS2と表記した。mmHAS2のcDNAのCOS細胞へのトランスフェクションは、粒子排除アッセイによって検出されるHA細胞被膜のデノボ産生を目的としており、これによってこのHAS2タンパク質がHAを合成し得ることを示す強力な証拠がもたらされた。ワタナベおよびヤマグチは、同様のアプローチを使用し、ヒト胎児脳cDNAライブラリーをスクリーニングしてhsHAS2を同定した。ファロップ他は、独立して同様の戦略を採用し

、実際にH Aを合成する卵巣偏平 (cumulus)細胞から分離されたR N A中のmmHAS 2を同定し、H Aの合成は排卵前濾胞中での正常偏平卵巣の膨張に対して重大なプロセスである。偏平細胞-卵母細胞複合体を、排卵サイクルが開始した直後に、H Aの合成が始まる前にマウスから分離し、および後の時点でH Aの合成がちょうど始まったとき (3時間目)あるいは既に明白となったとき (4時間目)に分離した。R T-P C Rが示すところによれば、H A S 2のm R N Aは初期には存在しないが、しかし3-4時間後には高水準で発現し、このプロセスにおいてH A合成をH A S 2の転写が制御していることを示唆している。双方のh s H A S 2は、長さがアミノ酸552個であり、98%相同である。mmHAS1は長さがアミノ酸583個であり、アミノ酸長が578であるh s H A S 1に対して95%相同である。

#### 【 0 0 1 7 】

最近、スパイサー他はP C Rアプローチを使用し、哺乳類中の第三のH A S遺伝子を同定した。このmmHAS3タンパク質はアミノ酸の長さが554であり、mmHAS1、mmHAS2、D G 42およびspHASに対してそれぞれ71%、56%、28%相同である。また、スパイサー他はこれら3種類のヒトおよびマウス遺伝子を3種類の異なる染色体に局在化した (H A S 1をh s C h r 19/mm C h r 17へ: H A S 2をh s C h r 8/mm C h r 15へ: H A S 3をh s C h r 16/mm C h r 8へ)。これら3種類のH A S遺伝子が異なる染色体上に局在化していること、および脊椎動物門の全体にH Aが発現していることは、この遺伝子属が古いものであり、イソ酵素が脊椎動物の進化の初期に重複によって発現したことを示唆している。また、細菌および真核細胞H A Sの間の相同性が高いこと (約30%)は、これら2種類が共通の先祖遺伝子を有することを示唆している。たぶん、初期の細菌は、真核遺伝子の産物が大きくなり、一層複雑となる前に、初期の脊椎動物の祖先からのH A S遺伝子を利用していたのであろう。又は、細菌は一層大きな脊椎動物のH A S遺伝子を得ることができ、酵素活性には必須ではない制御配列を削除できたのかもしれない。

#### 【 0 0 1 8 】

デビッドおよび共同研究者によるX. ラエビスD G 42の発見は、このタンパ

ク質がHAシンターゼであることは知られていなかったけれども、近年の前記の進歩に顕著な役割を果たしてきた。それにもかかわらず、DG42とspHASとが30%相同であることは、哺乳類のHAS2の同定を可能とするオリゴヌクレオチドを設計する上で重要であった。皮肉なことに、DG42が真正のHAシンターゼであるという決定的な証拠は、哺乳類イソ酵素の発見の後にしか報告されておらず、このときデアンジェリスおよびアチウサンは酵母（HAを合成できない生物）中で組換えタンパク質を発現させ、分離された膜に前記二種類の物質を供給した場合には、酵母がHAを合成することを示した。また、メイヤーおよびクレイルは、DG42のcDNAによってトランスフェクションした細胞からの溶出物によって、HAの合成水準が上昇することを示した。現在、DG42の機能は知られており、従ってX1HASと呼ぶことができる。

#### 【0019】

前記したすべてのHASタンパク質は、共通の予期された構造的特徴を共有しており、大きな中央ドメインと、タンパク質のアミノおよびカルボキシル末端の双方に2-3のトランスメンブランまたはメンブラン関連ドメインのクラスターを有する。この中央ドメインは、予期された細胞内HASタンパク質配列の最大約88%を含有しているが、おそらくは酵素の触媒領域を含有している。この予期された中央ドメインは、spHASにおいては264アミノ酸長であり（全タンパク質の63%）、真核細胞HAS属においては307-328残基数長さである（全タンパク質の54-56%）。メンブランドメインの正確な数と配向、および細胞外および細胞内ループのトポロジー的な構成とは、いずれのHASに対してもいまだ実験的に測定されていない。

#### 【0020】

spHASは、精製され、部分的にキャラクタリゼーションされたHAS属の種である。spHAS／アルカリホスファターゼ融合タンパク質を使用した初期の研究では、spHASのN末端、C末端および大きな中央ドメインが、実際に細胞の内側にあることが示された。spHASは6個のシステインを有しており、一方HAS1、HAS2およびHAS3はそれぞれ13、14および14個のシステイン残基を有する。spHAS中の6個のシステイン残基のうち2つは、HAS1とHAS2

とにおいて保存されており、相同である。これらすべてのHAS属の種において、一つの保存システイン残基のみが同じ部位に見いだされる(spHAS中のCys-225)。これは必須のCysであるかもしれず、これをスルフヒドリル毒によって修飾すると酵素活性が部分的に阻害される。ジスルフィド結合が存在する可能性、あるいは下記の複数のあらゆるHAS機能に必要な必須のCys残基の同定は、いまだHAS属のすべての種に対しては解決されていない。

#### 【 0 0 2 1 】

細胞膜での合成に対して提案された態様が特異であることに加えて、HAS酵素属は、HAの重合の全体に対して必要な多数の機能において極めて異常である。少なくとも6種類の異なる活性がHAS酵素内に存在する：2種類の異なる糖ヌクレオチド前駆体(UDP-GlcNAcおよびUDP-GlcA)の各々に対する結合部位、二種類の異なるグリコシルトランスフェラーゼ活性、成長中のHA重合体を酵素へとアンカーする一つ以上の結合部位(おそらくB-X7-Bモチーフに関連している)、および成長中の重合体を一度に一つの糖だけ移動させるラチェット様転移反応である。この後者の活性は、重合体が膜を通過して段階的に進行することに符合しているようである。これらの機能のすべては、およびおそらくは他の未知の機能は、419(spHAS)から588(xHAS)のアミノ酸のサイズ中に入る比較的にかさいタンパク質中に存在する。

#### 【 0 0 2 2 】

すべての入手可能な証拠は、spHASタンパク質のみが細菌中あるいはインビトロでのHAの生合成に必要であるという結論を支持しているけれども、一層大きな真核HAS属の種が、複数成分を有する複合体の一部であるという可能性がある。真核HASタンパク質はspHASよりも約40%小さいので、この付加されたタンパク質ドメインは、一層精密な機能、例えば細胞内トラフィッキングおよび局在化、酵素活性の調節、および他の細胞成分との相互作用の媒介に関与しているかもしれない。

#### 【 0 0 2 3 】

複数の脊椎動物HAS遺伝子が、異なるシンターゼをコード化しているという予期せざる発見は、HAが組織中の単なる構造的成分ではなく、細胞の挙動の重

要な調節因子であると言う、現在生じつつあるコンセンサスを強く支持している。このように、6カ月未満で、本分野は、一種類の既知のクローニングされたH A S (spHAS) から、複数の遺伝子属の認識へと移行し、これはH A の合成と生物学とを理解する上で、迅速で、多数のかつ興奮すべき将来の進歩を約束するものである。

【 0 0 2 4 】

例えば、本明細書に後で開示するものは、(1) パスツレラ ムルトシダからのおよび(2) パラメシウム ブルサリア クロレラウイルス (paramecium bur saria chlorella virus : P B C V - 1) からの2種類のH A S 遺伝子の配列である。これらの2種類の系中のヒアルロナンシンターゼの存在、およびこれら2種類の異なる系からのヒアルロナンシンターゼの精製および使用は、多数の異なる真核およびウイルス源中の酵素活性を有するヒアルロナンシンターゼをコード化する核酸配列を精製し、分離できることを示している。

【 0 0 2 5 】

C属のストレプトコッカス エクイシミリス株D 1 8 1は、ヒアルロン酸 (H A) を合成し、分泌する。研究者達は、この株とA属のストレプトコッカス ピオジェネス株、例えばS 4 3およびA 1 1 1を使用して、H A の生合成を研究し、H A 合成活性を、その二価カチオン要求量、前駆体 (UDP-GlcNAcおよびUDP-GlcA) 利用量および至適p Hという基準で特徴付けた。

【 0 0 2 6 】

伝統的には、H Aは、雄鶏のとさかか、あるいは連鎖球菌培養物からの細胞外培地のいずれかから分離することによって商業的に調製されていた。H Aを調製するために開発されてきた方法の一つは、H Aを精製する連鎖球菌の培養物を使用することによる。米国特許4, 517, 295号はこうした手順を記述しており、ここでH Aを生成する連鎖球菌を嫌気性条件下で炭酸ガスに富んだ育成培地中で発酵させる。これらの条件下でH Aを生成させ、ブロスから抽出できる。一般的には、雄鶏のとさかからH Aを分離することは労力がかかり、困難であると感じられている。なぜなら、H Aがより純度が低い状態から開始されるからである。雄鶏のとさかから分離することによる利点は、生成したH Aが一層高い分子



量を有することである。しかし、細菌発酵によってHAを調製する方が容易である。なぜなら、一層高い純度のHAから開始されるからである。しかし、一般的には、このようにして生成したHAの分子量は、雄鶏のとさかから得られたものよりも小さい。従って、細菌発酵によって高い分子量のHAを生成することを可能とする技術は、既存の手順に対して改善をもたらすであろう。

#### 【 0 0 2 7 】

より高い分子量を有するHAは、化粧品から眼科手術にわたる、広範囲の有用な用途がある。それが高い粘度と高い生体適合性とを有する可能性があることから、HAは硝子体液の置換物として眼科手術に特別な用途を見いだしている。また、HAは、HAを関節内注射することによって競争馬の外傷性関節炎を治療するのに使用されており、シェーピングクリームにおいて潤滑剤として使用されており、種々の化粧品製品において使用されており、これはHAの高い粘度の生理化学的特性と、長期間にわたって湿潤性を保持する性能によっている。実際、1997年の8月に、米国食品医薬品局は、高分子量HAを、影響を受けた関節内へと直接に注射することによって、高分子量のHAを使用して重度の関節炎を治療することを認可した。一般的には、採用したHAの分子量が高いほど良好である。これは、HA溶液の粘度が、この溶液中の個々のHA重合体分子の平均分子量と共に増加するからである。不幸なことに、非常に高い分子量のHA、例えば最大 $10^7$ にわたるHAは、現在入手可能な分離プロセスによっては得ることが難しかった。

#### 【 0 0 2 8 】

これらの問題点および他の問題点を解決するために、一種以上の特性の改善、例えば純度の向上や調製の容易化をもたらすHAを生成するのに使用できるような、新規な方法およびコンストラクトに対する要望がある。特に、現在商業的に可能なものに比べて、多量の相対的に高分子量および相対的に純粋なHAを生産するための方法を開発することが必要である。更に、変更されたサイズ分布（HA<sub>△,...</sub>）を有するHAおよび変更された構造（HA<sub>△,...</sub>）を有するHAを生産できる方法を提供する必要がある。

#### 【 0 0 2 9 】

本発明は、本分野における一種以上の欠点を解決する。組換えDNA技術を用し、酵素活性を有するseHASをコード化するコード領域を含む精製された核酸セグメントを、酵素活性を有するHAシンターゼを産生する方法、更にHASおよびそのヒアルロン酸産物を産生する組換え細胞を調製するのに際してこの核酸セグメントを使用する方法と共に開示し、クレームする。

【 0 0 3 0 】

ここで、本発明の目的は、酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含む精製された核酸セグメントを提供することである。

【 0 0 3 1 】

本発明の他の目的は、酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含む精製された核酸セグメントを含む組換えベクターを提供することである。

【 0 0 3 2 】

本発明の更に他の目的は、酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含む精製された核酸セグメントを含む組換えベクターを用いて形質転換された、組換え宿主細胞を提供することである。

【 0 0 3 3 】

本発明の更に他の目的は、HASを形質発現する細菌細胞を検出する方法を提供することである。

【 0 0 3 4 】

本発明の他の目的は、ヒアルロン酸シンターゼ遺伝子、例えばseHASから高分子量および／または低分子量のヒアルロン酸を産生する方法を提供することであり、また変更されたサイズ分布および／または修飾された構造を有するHAを産生する方法を提供することである。

【 0 0 3 5 】

本発明のこれらの目的および他の目的は、添付した明細書、請求の範囲および図面を参照すると明らかとなるであろう。

【 0 0 3 6 】

発明の概要

本発明は、ヒアルロン酸（HA）を調製する分野における一種以上の問題点を

解決するために、組換えDNA技術を適用することに係るものである。これらの問題点は、酵素活性を有するストレプトコッカス エクイシミリス (seHAS) ヒアルロネートシンターゼ遺伝子、即ちHA鎖の生合成を担う遺伝子をコード化するコード領域を含む核酸セグメントを分離し、使用することによって解決される。このseHAS遺伝子は、適切な細菌源のDNAからクローニングし、処理して、HAの調製用および多量のHAS酵素自体の調製用に有用な組換えコンストラクトにした。

【 0 0 3 7 】

本発明は、新規な遺伝子であるseHASを包含する。この遺伝子の発現は、食食作用および免疫検閲を回避する手段を与えることによって、A属およびC属の連鎖球菌株の病原性に関連している。「ヒアルロン酸シンターゼ」「ヒアルロネートシンターゼ」「ヒアルロナンシンターゼ」および「HAシンターゼ」の各用語は、互いに交換可能に使用されており、交互に現れるグルクロン酸とN-アセチルグルコサミン糖とからなり、 $\beta$ 1, 3および $\beta$ 1, 4連結されているグルコサミノグリカン多糖類鎖を重合させる酵素を記述するものである。「seHAS」という用語は、ストレプトコッカス エクイシミリスに由来するHAS酵素を記述するものである。

【 0 0 3 8 】

本発明は、ヒアルロネートまたはヒアルロン酸シンターゼ遺伝子、cDNAおよび遺伝子産物 (HAS) の分離およびキャラクタリゼーションに関するものであり、グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとをグリコサミノグリカンヒアルロン酸へと重合させるのに使用できる。本発明は、このseHASの遺伝子座を同定し、ストレプトコッカス エクイシミリスからの酵素活性を有するseHAS遺伝子をコード化する核酸配列を開示する。また、このHAS遺伝子は、ヒアルロン酸を産生するための細菌試料の可能性を評価するための新規なプローブを提供する。

【 0 0 3 9 】

本明細書に記載する技術および知識の用途を通して、本分野の当業者は、seHAS遺伝子をコード化する核酸セグメントを得ることができる。本分野の当業者が

認識できるように、本明細書の開示に基づいて、これらの利点は、H A S 遺伝子の発現を制御し、産生されるseHAS遺伝子産物であるseHAS酵素の性質を制御できるという点で著しく有用である。

【 0 0 4 0 】

従って、本発明は、酵素活性を有するH A S をコード化するコード領域を含む精製された核酸セグメントの分離に関するものであり、ここでH A S は真核あるいは原核のいずれかに由来する。これが可能であるのは、この酵素、および実際にこの遺伝子が、真核および幾つかの原核細胞の双方の中に見いだされるものであるからである。また、真核細胞はH A を産生することが知られており、従って本発明によって使用できるH A シンターゼ遺伝子を含んでいる。

【 0 0 4 1 】

本発明のH A シンターゼをコード化する核酸セグメントは、全染色体またはゲノムD N A から遊離して分離されているものとして定義され、これによってセグメントを組換えD N A 技術によって容易に操作できる。従って、本明細書で使用する際には、「精製された核酸セグメント」という節は、非関連染色体またはゲノムD N A から遊離して分離されており、組み換え技術の実施に有用に利用できる状態で保持されているD N A セグメントを指しており、例えば別に分離されたD N A フラグメント、あるいはこのフラグメントを含むベクター（例えば、プラスミド、ファージまたはウイルス）の形のD N A を指す。

【 0 0 4 2 】

本発明の好適な実施形態は、酵素活性を有するH A S をコード化するコード領域を含む、精製された核酸セグメントである。特に、この精製された核酸セグメントは配列番号2のseHASをコード化しているか、あるいは精製された核酸セグメントは、配列番号1によるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 4 3 】

本発明の他の形態は、酵素活性を有するH A S をコード化するコード領域を含む精製された核酸セグメントを含んでおり、精製された核酸セグメントは、配列番号1のヌクレオチド配列に対してハイブリダイゼーションする能力を有する。

【 0 0 4 4 】

また、本発明は、プラスミド、コスミド、ファージまたはウイルスベクターからなる天然又は組換えベクターである。組換えベクターも、酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含む核酸セグメントを含んでよい。

【 0 0 4 5 】

特に、精製された核酸セグメントが配列番号2のseHASをコード化しているか、または精製核酸セグメントが配列番号1によるヌクレオチド配列を含んでいる。もしこの組換えベクターがプラスミドである場合には、それは更に発現ベクターを含んでよい。また、この発現ベクターは、酵素活性を有するseHASをコード化する領域に操作可能なように連結されたプロモーターを含む。

【 0 0 4 6 】

本発明の他の好適な実施形態は、組換えベクターによって形質転換された組換え宿主細胞、例えば原核細胞からなる。この組換えベクターは、酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含む精製された核酸セグメントを含んでいる。特に、この精製された核酸セグメントが配列番号2のseHASをコード化するか、あるいは精製された核酸セグメントは、配列番号1によるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 4 7 】

また、本発明は、組換えベクターによってトランスフェクションされた組換え宿主細胞、例えば真核細胞であり、組換えベクターは、酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含む精製された核酸セグメントを含んでいる。特に、この精製された核酸セグメントが配列番号2のseHASをコード化しているか、あるいは精製された核酸セグメントは配列番号1によるヌクレオチド配列を含んでいる。この概念は、修飾された構造または変更されたサイズ分布を有するヒアルロン酸重合体を産生できる酵素として活性のHASをコード化する、特に修飾されたseHAS遺伝子を生成させることである。

【 0 0 4 8 】

更に、本発明は組換え宿主細胞に関するものであり、これをエレクトロポレートすることで、組換えベクターをこの組換え宿主細胞へと導入する。この組換えベクターは、酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含む精製され

た核酸セグメントを含んでいてよい。特に、精製された核酸セグメントが配列番号2のseHASをコード化するか、あるいは精製された核酸セグメントが配列番号1によるヌクレオチド配列を含んでいる。また、この酵素活性を有するHASは、変更された構造または変更されたサイズ分布を有するヒアルロン酸重合体を産生する能力を有していてよい。

【 0 0 4 9 】

本発明の更に他の実施形態は、組換えベクターによって転換された組換え宿主細胞であり、組換えベクターは、酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含む精製核酸セグメントを含んでいる。特に、精製された核酸セグメントは配列番号2のseHASをコード化し、あるいは精製された核酸セグメントは配列番号1によるヌクレオチド配列を含んでいる。また、この酵素活性を有するHASは、変更された構造または変更されたサイズ分布を有するヒアルロン酸重合体を産生する能力を有する。

【 0 0 5 0 】

また、本発明は精製された組成物であり、ここで精製された組成物は、酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含み、更に配列番号2によるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含有する。

【 0 0 5 1 】

本発明の他の実施形態では、DNA種を検出する方法を提供し、本方法は、(1) DNA試料を得るステップ、(2) 配列番号1による精製された核酸セグメントをこのDNA試料と接触させるステップ、(3) このDNA試料と、精製された核酸セグメントとをハイブリダイゼーションさせ、これによってハイブリダイゼーション複合体を生成させるステップ、および(4) この複合体を検出するステップを含んでいる。

【 0 0 5 2 】

また、本発明は、seHASをコード化するmRNAを発現する細菌細胞を検出する方法であり、本方法は、(1) 細菌細胞の試料を得るステップ、(2) この細菌細胞の試料からの少なくとも一種の核酸を、配列番号1による精製された核酸セグメントと接触させるステップ、(3) 少なくとも一種の核酸を、精製された

核酸セグメントとハイブリダイゼーションさせることによって、ハイブリダイゼーション複合体を生成させるステップ、および（４）このハイブリダイゼーションした複合体を検出するステップを含んでおり、ここでこのハイブリダイゼーション複合体の存在が、sellASをコード化するmRNAを発現する細菌株の指標となる。

【 0 0 5 3 】

また、本発明は、細胞中でsellASまたはspHASのいずれかの存在を検出する方法である。特に、本方法は、配列番号３－８に記載されたオリゴヌクレオチドをプローブとして使用することを含む。これらのオリゴヌクレオチドによって、実務家が、細胞中のseHASまたはspHASの存在を探索し、検出することが可能となる。

【 0 0 5 4 】

更に、本発明は、ヒアルロン酸を産生する方法であり、本方法は、（１）酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含む精製された核酸セグメントを宿主生物中へと導入するステップ（ここで宿主生物は、UDP-GlcNAcおよびUDP-GlcAを産生する酵素をコード化する核酸セグメントを含んでいる）、（２）この宿主生物を培地中で育成させてヒアルロン酸を分泌させるステップ、および（３）分泌されたヒアルロン酸を回収するステップを含む。

【 0 0 5 5 】

また、本方法は、培地から、分泌されたヒアルロン酸を抽出するステップを含んでいてよく、抽出されたヒアルロン酸を精製するステップを含んでいてよい。更に、この宿主生物は、構造的に修飾されたヒアルロン酸またはサイズが変更されたヒアルロン酸を分泌してよい。

【 0 0 5 6 】

更に、本発明は、予め選択された薬剤と、組換えHASによって産生された有効量のヒアルロン酸とを含有する薬剤組成物である。この薬剤組成物は、変更された分子量を有するヒアルロン酸を含有していてよく、この薬剤組成物は免疫反応を回避する能力を有する。また、こうして変更された分子量によって、この変更された分子量の薬剤組成物に対して親和性を有する患者内の特定の組織または細胞型を標的とできる薬剤組成物を生成させ得る。

## 【 0 0 5 7 】

また、本発明は、酵素活性を有するseHASをコード化する、精製および分離された核酸配列であり、ここでこの核酸配列は、(a)配列番号1による核酸配列であり、(b)配列番号1による核酸配列に相補的な核酸配列であり、(c)配列番号1による核酸に対してハイブリダイゼーションし得る核酸配列であり、および(d)配列番号1に相補的な核酸配列に対してハイブリダイゼーションし得る核酸配列である。

## 【 0 0 5 8 】

更に、本発明は、実質的に、酵素活性を有するHASをコード化する核酸セグメントからなる、精製および分離された核酸セグメントである。

## 【 0 0 5 9 】

また、本発明は、seHASをコード化する核酸セグメントから実質的に構成される分離された核酸セグメントであり、seHASは配列番号1による核酸セグメントと十分に重複する核酸セグメントを含んでおり、これによって酵素活性を有するHASをコード化する生物学的特性の保持が可能となっている。

## 【 0 0 6 0 】

また、本発明は、酵素活性を有するHASをコード化するコード領域を含む精製された核酸セグメントであり、ここで精製された核酸セグメントは、配列番号1によるヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションする能力を有する。

## 【 0 0 6 1 】

## 発明の詳細な説明

本発明の少なくとも一つの実施形態を詳細に説明する前に、次の説明文または図面の中の説明に記載した構成の詳細および要素配置には、本発明の適用は制限されないものであることが理解されるべきである。本発明は、他の実施形態であってよく、あるいは種々の方法で実施し、実行され得る。また、本明細書における文節表現および用語は、説明の便宜のためのものであり、本発明を制限するものとして見なされてはならないことが理解されるべきである。

## 【 0 0 6 2 】

本明細書で使用する際には、「核酸セグメント」および「DNAセグメント」



という用語は交換可能なように使用されており、特定種の全ゲノムDNAから遊離して分離されたDNA分子を指す。従って、本明細書で使用する「精製された」DNAまたは核酸セグメントは、ヒアルロネートシンターゼ（HAS）コード配列を含むDNAセグメントを指しており、非関連ゲノムDNA、例えばストレプトコッカス エクイシミリスの全体、あるいは例えば哺乳類宿主ゲノムDNAから分離された、あるいは遊離して精製されたものを指す。本明細書に含まれる「DNAセグメント」という用語は、DNAセグメントおよびこのセグメントの、局小さいフラグメントであり、また例えばプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスなどを含む組換えベクターである。

#### 【0063】

同様に、分離あるいは精製されたseHAS遺伝子を含有するDNAセグメントは、他の自然発生した遺伝子やタンパク質をコード化する配列から実質的に離れて分離された、HASをコード化する配列を含むDNAセグメントを指している。この点において、「遺伝子」という用語は、単純化のために機能性タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコード化する単位を指すために使用されている。本分野の者には理解されるであろうように、この機能的な用語には、ゲノム配列、cDNA配列またはその組み合わせが含まれる。「他のコード領域から実質的に離れて分離された」とは、目的とする遺伝子が、この場合にはseHASが、DNAセグメントのコード領域の大部分を形成しており、このDNAセグメントが、自然発生するコード化DNAの大部分、例えば大きな染色体フラグメントまたは他の機能性遺伝子またはDNAコード化領域を含有していないことを意味する。もちろん、これは最初に分離されたDNAセグメントを指しているが、後で付加された遺伝子またはコード領域を排除しておらず、あるいは人間の手によってこのセグメント中へと意図的に残されたコード領域を排除していない。

#### 【0064】

原核生物源を使用することによる特定の利点によって、原核生物、例えばA. ピオジェネス、S. エクイシミリス、あるいはP. プルトシダからのHAS遺伝子を分離することに最も利益があることを認識できそうである。こうした利点の一つは、典型的には、真核酵素には、真核宿主中でしか実現できない顕著な翻訳

後修飾を必要とし得ることである。これによって、得られたあらゆる真核H A シンターゼ遺伝子の用途が制限される傾向がある。更に、本分野の当業者は、時間の点と、原核酵素遺伝子を採用しようとしている遺伝子操作の容易さの点で、更なる利点を認識しそうである。これらの更なる利点として、( a ) ゲノムのサイズが比較的小さいことによって、原核生物の遺伝子の分離が容易であり、従って、対応するゲノムライブラリーのスクリーニングの量が減少し、( b ) 原核生物の遺伝子のコード領域の全体のサイズが、イントロンがないことによって著しく小さいことから、操作が容易であることが挙げられる。更に、もしseHAS遺伝子の産物(例えば酵素)に翻訳後修飾が必要である場合には、これは遺伝子が由来する原核細胞環境(宿主)中で最も良く実現できる。

【 0 0 6 5 】

好ましくは、本発明によるD N A 配列には、更に選択された組換え宿主中の配列の発現を可能とする遺伝子制御領域を含ませることができる。もちろん、採用する制御領域の性質は、一般的には、計画する特定の用途(例えばクローニング用宿主)に依存して変化するであろう。

【 0 0 6 6 】

本発明の特定の実施形態は、seHAS遺伝子をコード化するD N A 配列を包含する分離D N A セグメントおよび組換えベクターに関するものであり、これはそのアミノ酸配列の中に、配列番号2によるアミノ酸配列を含んでいる。更に、本発明の他の特定の実施形態は分離D N A セグメントおよび組換えベクターに関するものであり、D N A セグメントおよび組換えベクターは、H A S 遺伝子またはストレプトコッカス エクイシミスH A S に対応するD N A 、特にH A S 遺伝子またはc D N A のアミノ酸配列を、そのアミノ酸配列中に含む遺伝子をコード化するD N A 配列を包含している。例えば、このD N A セグメントまたはベクターが全長H A S タンパク質をコード化する場合には、あるいはH A S タンパク質の発現に使用することを意図している場合には、好適な配列は、実質的に配列番号2に記載された配列である。

【 0 0 6 7 】

H A シンターゼとしての活性を有する核酸セグメントは、本明細書に記載した

方法によって分離できる。「実質的に配列番号2に記載した配列」という用語は、この配列が配列番号2の一部分に実質的に対応しており、配列番号2のアミノ酸と同一ではない、あるいは生物学的機能が等価である比較的に少数のアミノ酸を有していることを意味する。「生物学的な機能が等価」という用語は、本分野において良く知られており、本明細書において更に詳細に定義すると、実質的に配列番号2に記載の配列を有する遺伝子であり、原核細胞がHAまたはヒアルロン酸被膜を産生する能力に関連している。

#### 【 0 0 6 8 】

例えば、seHASおよびspHASコード配列は約70%相同であり、アデニン塩基（A）およびチミン（T）塩基に富んでいる。seHASにおける塩基含有量は、Aが26.71%であり、Cが19.13%であり、Gが20.81%であり、Tが33.33%である（A/T=60%）。一方、spHASでは、Aが31.34%であり、Cが16.42%であり、Gが16.34%であり、Tが35.8%である（A/T=67%）。本分野における当業者は、70%の相同性にもかかわらず、seHASコード配列がspHAS遺伝子とハイブリダイゼーションせず、逆もまた真であることに驚かされるであろう。この予期せざる交差ハイブリダイゼーションの不可能性は、オープンリーディングフレームの全体にわたって mismatches 塩基が短期の阻止をもたらすことに起因しているかもしれない。spHASとseHASとが交差ハイブリダイゼーションできないことを図1に示す。seHASおよびspHASコード配列の双方に共通の相同ヌクレオチドの最も長いストレッチは、僅かに20ヌクレオチドである。更に、非常にA-Tに富んだ配列は、G-Cに富んだ配列に比べて安定性の低いハイブリダイゼーション複合体しか生成しないであろう。他の可能な説明は、双方の配列中のAsまたはTsの幾つかのストレッチが、誤配向した状態あるいは不安定な状態でハイブリダイゼーションし得るということであるかもしれない。これによって、seHASおよびspHAS遺伝子配列が相互に枠の外側へと置かれることになり、これによって産生ハイブリダイゼーションの蓋然性が減少する。

#### 【 0 0 6 9 】

70%相同であるタンパク質をコード化する二つの遺伝子が互いに交差ハイブ

リダイゼーションできないという特異な現象のために、クレームされた核酸セグメントをその機能の観点から考慮することが有益である：即ち、酵素活性を有するヒアルロン酸シンターゼをコード化する核酸セグメントであるという観点である。本分野の当業者であれば、酵素活性を有するヒアルロン酸シンターゼをコード化する核酸セグメントは、配列番号1および2に記載の配列に対して保存されたあるいは半保存された置換物を含有していてよく、なお本発明の範囲内に入ることを了解できる。

【 0 0 7 0 】

特に、本分野は、実務家がある核酸セグメントへと構造的変化をもたらし（即ち、保存された、あるいは半保存されたアミノ酸置換をコード化し）、しかもその酵素としてあるいは機能的な活性を保持できるという事例に溢れている。例えば、（1）リスラー他「構造的に関連するタンパク質におけるアミノ酸置換：パターン認識的アプローチ（Amino Acid Substitutions in Structurally Related Proteins: A Pattern Recognition Approach）」（J. Mol. Biol.）204:1019-1029、1988年参照：「アミノ酸側鎖の交換可能性の観測に従うと、四種類のグループだけが記述できた：（i）I l eおよびV a l；（ii）L e uおよびM e t；（iii）L y s、A r gおよびG l n；および（iv）T y rおよびP h eである」；（2）ニーフアインド他「主鎖折り畳みアノリに由来するタンパク質モデリングおよび配列アラインメントに対するアミノ酸の類似係数（Amino Acid Similarity Coefficients for Protein Modeling and Sequence Alignment Derived from Main-Chain Folding Anoles）」（J. Mol. Biol.）219:481-497（1991年）参照「類似性パラメーターによって、アミノ酸の置換を設計することが可能となる」；および（3）オヴァリントン他「環境特異的なアミノ酸置換表：ターシャリー鑄型とタンパク質の折り畳みの予測（Environment-Specific Amino Acid Substitution Tables: Tertiarily Templates and Prediction of Protein Folds）」（Protein Science）1: 216-226（1992年）参照「局所的環境の関数として観測した置換のパターンを分析したところ、顕著なパターンがあることを発見した・・・適合性のある変化をもたらすことができる。」

これらの文献および無数の他の文献は、本分野の当業者であれば、ある核酸配

列を与えれば、その機能を変化させることなしにその核酸配列に対して置換および変更を加えることができることを示している。また、置換された核酸セグメントは高度に相同性であり、その変化していない親についての酵素活性を保持し、しかも未だこれに対してハイブリダイゼーションしないものであってよい。

## 【 0 0 7 1 】

本発明で開示する核酸セグメントは、酵素活性を有するヒアルロン酸シンターゼ-seHASおよびspHASをコード化する。seHASとspHASとは70%相同であり、双方が酵素活性を有するヒアルロン酸シンターゼをコード化しているけれども、これらは交差ハイブリダイゼーションしない。ここで、本分野の当業者は、配列番号1に列記したseHASの核酸セグメントに対して、本発明のクレームの範囲外へと出ることなしに、置換を行うことができることを了解できる。標準化され、許容されている機能的に等価なアミノ酸置換を表1に示す。

## 【 0 0 7 2 】

【表1】

表 1

アミノ酸群	保存されたおよび半保存された置換物
非極性R群	アラニン、バリン、ロイシン、 イソロイシン、プロリン、メチオニン、 フェニルアラニン、トリプトファン
極性であるが、荷電していないR群	グリシン、セリン、スレオニン、 システイン、アスパラギン、グルタミン
負に荷電したR群	アスパラギン酸、グルタミン酸
正に荷電したR群	リジン、アルギニン、ヒスチジン

## 【 0 0 7 3 】

本発明の他の好適な実施形態は、配列番号2によるタンパク質をコード化する精製された核酸セグメントであり、組換えベクターとして更に定義する。本明細書で使用する際には、「組換えベクター」という用語は、HASタンパク質をコード化する核酸セグメントあるいはそのフラグメントを含むように修飾されたベクターを指す。この組換えベクターは、前記HASをコード化する核酸セグメントに操作可能なように連結されたプロモーターを含む発現ベクターとして更に定義できる。

## 【 0 0 7 4 】

本発明の更に好適な実施形態は、H A S 遺伝子を含む組換えベクターによって組換え体とされた宿主細胞である。好適な組換え宿主細胞は、原核細胞であってよい。他の実施形態においては、この組換え宿主細胞は真核細胞である。本明細書で使用する際には、「処理された」あるいは「組換え」細胞という用語は、組換え遺伝子、例えばH A S をコード化する遺伝子が内部へと導入された細胞を指すことを意図している。従って、処理された細胞は、組み換え体として導入された遺伝子を含むしない自然発生的な細胞とは区別できる。このように処理された細胞は、人間の手によって導入された一つあるいは複数の遺伝子を有する細胞である。組み換えによって導入された遺伝子は、c D N A 遺伝子の形であってよく、ゲノム遺伝子の形であってよく、あるいは特に導入された遺伝子に天然では関連していないプロモーターに隣接して配置された遺伝子を含むしている。

## 【 0 0 7 5 】

組換えH A シンターゼを産生するために使用する場合のように、連鎖球菌以外の宿主を使用することを望む場合には、大腸菌、B. サブティリス、ラクトコッカス s p . のような原核系を採用することが有利であり、あるいは酵母、中国ハムスターの卵巣、アフリカミドリザルの人造細胞、V E R O 細胞などのような真核系でさえも採用することが有利であり得る。もちろん、これを採用した場合には、一般的には選択された他の宿主中で機能する配列の制御下でH A シンターゼ遺伝子を運ぶことが望ましい。適切なD N A 制御配列、およびその構成および使用方法は、一般的に本分野において既知であり、本明細書において一層詳細に議論する。

## 【 0 0 7 6 】

好適な実施形態においては、H A シンターゼをコード化するD N A セグメントは、更に本分野において複製の原型あるいは「レプリコン」として機能が知られているD N A 配列を含むしており、これによって特定の宿主による連続的な配列の複製が可能となる。こうした原型によって、染色体外に局在化し、複製するキメラセグメントまたはプラスミドを調製することが可能となり、これらに対してH A シンターゼD N A 配列を連結させる。一層好適な場合には、採用した原型が

、バイオテクノロジー用途に適した細菌宿主中で複製可能なものである。しかし、クローニングされたDNAセグメントを一層汎用性とするためには、（例えばシャトルベクターにおけるように）使用を企図する他の宿主系が認識する原型を、代わりにあるいは付加的に採用することが望ましい場合がある。

【 0 0 7 7 】

S V 4 0、ポリオーマまたはウシパピローマウイルス源のような他の複製源を分離し、使用することは、多数の高等生物におけるクローニングまたは発現に採用できるが、本分野の当業者には良く知られている。従って、特定の実施形態においては、本発明は組換え形質転換ベクターとして定義され、ベクターは、適切な複製源と共に、選択された制御領域の制御下にあるHAシターゼをコード化する遺伝子配列を含む。

【 0 0 7 8 】

ここで、本分野の当業者であれば評価できるように、本明細書の開示に基づいて、他の手段をHAS遺伝子またはcDNAを得るために採用できる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応またはR T - P C R法によって産生された、cDNAライブラリーのような、多数の源からの遺伝子またはcDNAの全補体を含有するDNAフラグメントを得ることができ、源には連鎖球菌の他の株または真核源が含まれる。実質的にあらゆる分子クローニングのアプローチを、本発明によるDNAフラグメントの生成に利用できる。このように、DNAを分離するために採用される特定方法に対する一般的な制限は、分離された核酸が生物学的機能が等価なHAシターゼをコード化しなければならない点だけである。

【 0 0 7 9 】

いったんこのDNAが分離されると、DNAは選択されたベクターと連結される。実質的にあらゆるクローニングベクターを採用し、本発明による利点を実現できる。典型的な有用なベクターとしては、原核生物用のプラスミドおよびファージがあり、真核生物用のウイルスベクターさえも挙げられる。例としては、p K K 2 2 3 3、p S A 3、組換えラムダ、S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、ウシパピローマウイルスおよびレトロウイルスがある。しかし、ラクトコッカスまたはバシラス株と大腸菌との双方において複製能力を有するベクターを

採用したときに、特に利益が最終的に実現されるものと考えられる。

【 0 0 8 0 】

ダオおよびフェレッティの p S A 3 ベクターあるいはトリュークアウト他の p A T 1 9 ベクターによって例示されるような、例えばこれらのベクターによって、大腸菌のような容易に操作可能な宿主中でクローンコロニーの選択を実施することができ、次いで H A を産生させるために食品等級のラクトコッカスまたはバシラス株へと引き続いて戻すことができる。これらは、バイオテクノロジー産物および特定食品を生産する際に使用される、良性で良く研究された生物である。これらが有利であるのは、ラクトコッカスまたはバシラス株が H A を合成する能力を遺伝子投与（即ち、H A シンターゼ遺伝子の更なるコピーを複製によって供給すること）によって増加させることができるという点にあり、および／または、付加的な遺伝子を含有させることによって H A 前駆体の利用可能性を改善できるという点にある。また、細菌が H A を合成する固有の能力は、H A シンターゼ遺伝子を担持するプラスミドの別のコピーの生成、あるいは複製によって増大させることができる。この複製によって、プラスミドのコピー数、従って、H A シンターゼ遺伝子のコピー数が最大 1 0 倍に上昇することを説明できる。

【 0 0 8 1 】

H A シンターゼ遺伝子のコピー数を更に増大させるであろう他の手順は、遺伝子の複数のコピーをプラスミド中へと挿入することである。他の技術としては、H A S 遺伝子を染色体 D N A 中へとインテグレートすることが挙げられる。この更なる複製は特に実現できそうである。なぜなら、細菌性の H A シンターゼ遺伝子のサイズは小さいからである。幾つかのシナリオにおいては、この染色体 D N A 連結ベクターを採用して、クローンスクリーニングの目的のために選択した宿主、例えば大腸菌を、選択された宿主中で挿入 D N A を発現できるベクターを用いてトランスフェクションする。

【 0 0 8 2 】

真皮、滑膜繊維芽細胞または雄鶏のとさかの細胞のような真核源を採用した場合には、最初は c D N A ライブラリーを調製することから始めようと望むであろう。これを実施する際には、最初に上記の細胞から m R N A を分離し、次いで逆



転写酵素活性を有する酵素を用いて二本鎖 c D N A を調製し、選択されたベクターと連結する。二本鎖 c D N A を調製するためには本分野において多数の可能性がある、既知であり、すべてのこうした技術は適用可能であると考えられる。好適な技術としては逆転写が挙げられる。いったん二本鎖 c D N A の集団を得たら、選択された宿主中で、許容される技術、例えば適切なベクター中への連結または適切な宿主中での複製によって c D N A ライブラリーを調製する。多数のクローンが得られること、および多数のクローンを本明細書に記載の技術によってスクリーニングするのが比較的容易なことから、c D N A クローンをクローニングおよび発現スクリーニングする際に、ファージ発現ベクター、例えば  $\lambda$  g t 1 1、 $\lambda$  g t 1 2、 $\lambda$  G e m 1 1、および／または  $\lambda$  Z A P の採用が望ましい場合がある。

#### 【 0 0 8 3 】

ある他の具体例において、本発明は、実質的に配列番号 1 に記載された核酸配列をその配列内に含む単離された D N A セグメントおよび組換えベクターに関する。「実質的に配列番号 1 に記載された」という用語は、前記されたのと同じ意味で使用され、核酸配列が配列番号 1 の一部と実質的に対応し、配列番号 1 のコドンと同一または機能的に同等ではない比較的少ないコドンを有することを意味する。「機能的に同等のコドン」という用語は、ここでは、表 I に記載されたように、アルギニンまたはセリンについての 6 個のコドンのような、同一アミノ酸をコードするコドンをいい、また、生物学的に同等のアミノ酸をコードするコドンをいう。

#### 【 0 0 8 4 】

また、アミノ酸および核酸配列は、さらなる N - もしくは C - 末端アミノ酸または 5 ' もしくは 3 ' 核酸配列のような、さらなる残基を含むことができ、配列が、依然として、蛋白質発現および酵素活性に関する場合に生物学的蛋白質活性の維持を含めた、前記した基準に合致する限りは、実質的にここに開示した配列のうちの 1 つに記載されていることも理解されるであろう。末端配列の付加は、特に、例えば、コード領域の 5 ' または 3 ' 部分いずれかに近接してそれを挟む種々の非コーディング配列を含むことができるか、あるいは遺伝子内に起こるこ

とが知られている種々の内部配列を含むことができる核酸配列に適用される。特に、真核生物における11A5遺伝子のアミノ酸配列は原核生物で見出されるよりも40%大きいようである。

【0085】

遺伝コードの縮重ならびに保存されたおよび半保存された置換を可能とすると、配列番号1のヌクレオチドと同一であるヌクレオチドの約40%および約80%の間；またはより好ましくは約80%および約90%の間；またはさらにより好ましくは約90%および約99%の間を有する配列は「実質的に配列番号1に記載されている」配列であろう。配列番号1に記載されたものと実質的に同一である配列は、標準的なまたはよりストリンジェントではないハイブリダイジング条件下で配列番号1の補体を含有する核酸セグメントにハイブリダイズすることができる配列と機能的に定義することもできる。適当な標準的ハイブリダイゼーション条件は当業者によく知られており、本明細書に明瞭に記載される。

【0086】

本明細書で用いる「標準的なハイブリダイゼーション条件」という用語は、実質的に相補的な核酸セグメントが標準的なワトソン-クリック塩基対合を形成するであろう条件を記載するのに使用される。pH、温度、塩濃度、ホルムアミドおよびジメチルスルホキシドのような剤の存在、ハイブリダイズするセグメントの長さ等のような、結合またはハイブリダイゼーションの特異性を決定する多数の因子が知られている。より短い核酸セグメント、例えば、約14および約100ヌクレオチドの間の断片がハイブリダイゼーションで使用されることが考えられる場合、ハイブリダイゼーションについての塩および温度の好ましい条件は40～50℃における1.2～1.8×HPBを含むであろう。

【0087】

当然に、本発明は、配列番号1に記載された配列と相補的であるまたはそれと実質的に相補的であるDNAセグメントも含む。「相補的」である核酸配列は、標準的なワトソン-クリック相補性則に従って塩基対合できるものである。本明細書で用いるように、「相補的配列」という用語は、前記した同一ヌクレオチド比較によって評価できるように、あるいは配列番号1の核酸セグメントにハイブ

リダイズできるものと定義されるように、実質的に相補的である核酸配列を意味する。

【 0 0 8 8 】

コーディング配列それ自体の長さに拘わらず、本発明の核酸セグメントは、それらの総じての長さがかなり変化できるように、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、多重クローニング部位、エピトープタグ、ポリヒスチジン領域、他のコーディングセグメント等のような、他のDNA配列と組み合わせることができる。従って、ほとんどいずれの長さの核酸断片も使用することができると考えられ、全長は好ましくは調製の容易性および意図した組換えDNAプロトコルにおける使用によって制限される。

【 0 0 8 9 】

当然に、本発明は、配列番号1および2の特別の核酸およびアミノ酸配列に限定されないことも理解されるであろう。従って、組換えベクターおよび単離されたDNAセグメントは、HASコード領域それ自体、選択された改変または修飾を基本的コード領域中に担持するコード領域を種々に含むことができ、あるいはそれらはそれにも拘わらずHASコード領域を含むより大きなポリペプチドをコードすることができるか、あるいは変異体アミノ酸配列を有する生物学的に機能的同等蛋白質またはペプチドをコードすることができる。

【 0 0 9 0 】

例えば、本発明者らは、2つの他の系：(a) グラム陰性菌 *Pasturella multocida* (配列番号19)；および(b) クロレラウイルス PBCV-1 (配列番号：7および8) においてヒアルロン酸シンターゼを見出し、特徴付け、そして精製した。これらの2つの系におけるヒアルロン酸シンターゼおよびこれらの2つの系からのヒアルロン酸シンターゼを精製し、それを使用する本発明者らの能力は、酵素的に活性なヒアルロナンシンターゼをコードする核酸配列を精製し、単離する本発明者らの能力を示す。

【 0 0 9 1 】

Carter型Aの *P. multocida* (配列番号19) の莢膜は、長い間、ヒアルロン酸-HAを含有すると疑われてきた。*P. multocida*のHA合成の特徴は、それとse

HASおよびspHAS蛋白質の間の興味深い酵素学的差異に導いた。

【 0 0 9 2 】

*P. multocida*細胞は容易に目に見える細胞外HA莢膜を生じ、2つのstreptococcal HASは膜蛋白質であるので、家禽コレラ病原体の膜調製物をテストした。初期のトライアルにおいて、streptococcal HAS活性を測定するためのものと同様の条件下でアッセイすると、超音波処理に由来する粗製膜画分は単独でHAへの非常に低レベルのUDP-GlcNAc 依存性UDP- $[^{14}\text{C}]$  GlcA取り込み $[\sim 0.2 \text{ pmol}$ のGlcA導入(蛋白質 $\mu\text{g})^{-1}\text{h}^{-1}]$ を保有した。組換えhasAプラスミドを持つ大腸菌からの酵素もまた最初単離しにくかった。これらの結果は、同様の方法によって、streptococcusから得られた容易に検出できる量とは対照的であった。

【 0 0 9 3 】

超音波処理と組み合わせたプロテアーゼ阻害剤の存在下での氷冷リソソーム処理を用いる別の調製プロトコルは、グラム陰性菌の両種からのHAS活性の実質的回収を可能した。 $5 \sim 10 \text{ pmol}$ のGlcAが導入されたHASについての特異的活性(蛋白質 $\mu\text{g})^{-1}\text{h}^{-1}$ は、新しい方法で野生型*P. multocida*の粗製膜につきルーチン的に得られた。UDP-GlcNAcの不存在下では、UDP- $[^{14}\text{C}]$  GlcAからの放射能は、より高い分子量の物質に実質的には取り込まれなかった(両糖前駆体の同一アッセイの $< 1\%$ )。無莢膜突然変異体TnAから調製された膜は、両糖ヌクレオチド前駆体を補足した場合、検出可能なHAS活性は保有しなかった(データは示さず)。Sephaeryl S-200カラムを用いるゲル濾過分析は、イン・ビトロで合成された $^{14}\text{C}$ -標識生成物の大部分の分子量が $2.8 \times 10^4 \text{ Da}$ であることを示す。というのは、該物質はボイド容量に溶出するので、このような値は少なくとも400モノマーよりなるHA分子に対応するからである。この生成物はStreptomycesヒアルロニダーゼ消化に感受性であるが、プロテアーゼ処理に対しては抵抗性である。

【 0 0 9 4 】

HASアッセイのパラメーターを変化させて、*P. multocida*膜によるUDP-糖の多糖への取り込みを最大化した。Streptococcal spHASは $\text{Mg}^{2+}$ を要し、従っ

て、この金属イオンは、*P. multocida*膜の最初のアッセイに含まれた。*P. multocida* HAS (pmHAS)は、トリス型緩衝液中でpH 6.5ないし8.6で比較的活性であり、pH 7で最適である。HAS活性は、少なくとも1時間、中性pHにて、インキュベーション時間に対して直線的であった。より高いイオン強度ではpmHASは見かけ上活性が低かった。何故ならば、50 mM トリス、pH 7 および 20 mM  $MgCl_2$ を含有する反応への100 mM  $NaCl$ の添加は～50%だけ糖取り込みを減少させたからである。

#### 【 0 0 9 5 】

pmHASの金属イオン特異性はpH 7で評価した。EDTAの存在下における金属フリー条件下では、多糖への放射標識前駆体の取り込みは検出できなかった（最大シグナルの<0.5%）。 $Mn^{2+}$ は、テストした金属（ $Mg$ 、 $Mn$ 、 $Co$ 、 $Cu$ 、および $Ni$ ）についての最低イオン濃度での最高取り込みを与えた。 $Mg^{2+}$ は10倍高い濃度におけるを除き $Mn^{2+}$ 刺激の約50%を与えた。10 mMにおいて $Co^{2+}$ または $Ni^{2+}$ は、より低いレベルの活性（1 mM  $Mn^{2+}$ アッセイの、各々、20%および9%）を支持したが、10 mM  $Cu^{2+}$ が供給された膜は不活性であった。事実、10 mM  $Cu^{2+}$ および20 mM  $Mg^{2+}$ と膜調製物との混合の結果、標識は多糖にはほとんど取り込まれなかった（ $Mg$ のみの値の<0.8%）。

#### 【 0 0 9 6 】

pmHASの最初の特徴付けは、 $Mg^{2+}$ の存在下で行った。その糖ヌクレオチド前駆体についての酵素の結合親和性は、見掛けの $K_m$ 値を測定することによってアッセイした。 $[^{14}C]$  GlcAまたは $[^3H]$  GlcNAcの多糖への取り込みは、各々、UDP-GlcNAcまたはUDP-GlcAの変化した濃度でモニターした。 $Mg^{2+}$ -含有緩衝液において、UDP-GlcAについての～20  $\mu M$ およびUDP-GlcNAcについての～75  $\mu M$ の見掛けの $K_m$ 値は、滴定データのHanse-Woolfプロット（ $[S] / v$  対  $[S]$ ）を利用して決定した。両糖についての $V_{max}$ 値は同一であった。何故ならば、Hanse-Woolfプロットに対応する傾きは同等だったからである。 $Mg^{2+}$ でのアッセイからの結果と比較すると、UDP-GlcNAcについての $K_m$ 値は、約20-50%だけ～105  $\mu M$ まで増加し、 $V_{max}$ は $Mn^{2+}$ の存在下で2-3倍だ

け増加した。

【 0 0 9 7 】

*P. multocida*, *S. equisimilis*または*S. pyogenes*いずれかからのH A シンターゼ酵素はUDP-糖を利用するが、それらはp Hおよび金属イオン依存性および $K_m$ 値に関して幾分異なった反応速度最適を保有する。酵素はp H 7で最も活性であり；しかしながら、pmHASは、報告されているところでは、わずかに酸性のp Hでより活性を呈し、p H 7. 4を超えると比較的不活性である。pmHASはイン・ビトロアッセイ条件下では、 $Mg^{2+}$ よりも効果的に $Mn^{2+}$ を利用するが、細菌細胞における生理学的金属共因子の同一性は知られていない。比較すると、streptococcal酵素での従前の研究では、 $Mg^{2+}$ は $Mn^{2+}$ よりもかなり良好であったが、それにも拘わらず、 $Mn^{2+}$ のより小さい効果は、最適 $Mg^{2+}$ 濃度よりも10倍低い濃度において最大であった。pmHASは、明らかに、spHASよりもしっかりとUDP-糖に結合する。粗い膜中においてpmHASについての測定された $K_m$ 値は、streptococcal膜で見出されたHASから得られたものよりも各基質につき約2～3倍低かった：各々、UDP-GlcAにつき50または39  $\mu M$ およびUDP-GlcNAcにつき500または150  $\mu M$ 。

【 0 0 9 8 】

速度論的解析によって、pmHASの $V_{max}$ は $Mg^{2+}$ よりも $Mn^{2+}$ の存在下で2～3倍高かったが、前者のイオンでのアッセイにおいては、UDP-GlcNAc  $K_m$ 値はわずかに増加した。見掛けの低下した親和性のこの観察は、増大した重合速度は、 $Mn^{2+}$ イオン／糖ヌクレオチド複合体の酵素活性部位（類）への良好な結合によるものではなかった。従って、 $Mn^{2+}$ はいくつかの他の反応工程を増強させ、もう1つの部位／酵素の構造を改変し、あるいはリン脂質膜環境を修飾する可能性がある。pmHASの遺伝子配列および蛋白質配列を配列番号19に示す。

【 0 0 9 9 】

クロレラウイルスPBCV-1は、多糖、ヒアルロナン〔ヒアルロン酸、H A〕を合成できる機能的グリコシルトランスフェラーゼをコードする。この知見は、ウイルスは、（a）宿主細胞グリコシルトランスフェラーゼを利用して新しい炭水化物構造を作り出すか、または（b）ビリオン成熟の間に宿主細胞グリココ

ンジュゲートを蓄積するかのいずれかであるという一般的観察に反する。さらに、H A は、一般に、動物および少数のそれらのビルレント細菌病原体に限定れるとみなされてきた。多くの植物炭水化物が特徴付けられてきたが、H A も関連アナログも従前には植物または原生生物の細胞では検出されていない。

#### 【 0 1 0 0 】

脊椎動物H A S 酵素 ( D C 4 2 、 H A S 1 、 H A S 2 、 H A S 3 ) およびstreptococcal HasA酵素 ( spHASおよびscHAS) は、配列同様のいくつかの領域を有する。ウイルスP B C V - 1 [Paramecium bursariaクロレラウイルス] の二本鎖DNAゲノムを配列決定すると、種々のH A S に対して28ないし33%アミノ酸同一性を持つ567残基蛋白質をコードするO R F [オープンリーディングフレーム]、A 9 8 S (受入番号# 4 4 2 5 8 0) が発見された。この蛋白質はc v H A Sと命名された(クロレラウイルスH A シンターゼ)。P B C V - 1をコードする遺伝子配列およびその蛋白質配列は配列番号: 7および8に示される。

#### 【 0 1 0 1 】

P B C V - 1 は、ある種の単細胞、真核生物クレラー様緑藻中で複製する大きな(175-190nm直径)多角体プラーク形成ウイルスのファミリー(Phycodnaviridae)のプロトタイプである。P B C V - 1 ビリオンは、外方糖蛋白質キャプシド内側に位置する少なくとも50の異なる蛋白質および脂質成分を含有する。P B C V - 1 ゲノムは、共有結合閉環ヘアピン末端を持つ線状の変更されていない330-kb dsDNA分子である。

#### 【 0 1 0 2 】

推定されたアミノ酸配列に基づき、A 9 8 R 遺伝子産物は、一体的膜蛋白質であるはずである。この仮説を検定するために、組換えA 9 8 R をEscherichia coli中で産生させ、膜画分をH A S 活性につきアッセイした。UDP-GlcAおよびUDP-GlcNAcは、対照細胞からの試料(平均特異的活性<0.001pmole GlcA導入/ $\mu$ g蛋白質/分)によってではなく、プラスミドp C V H A S 上のA 9 8 R 遺伝子含有する細胞に由来する膜画分(平均特異的活性2.5pmole GlcA導入/ $\mu$ g蛋白質/分)によって、多糖に取り込まれた。p C V H A S で形質転換した細

胞の可溶性画分で活性は検出されなかった。UDP-GlcAおよびUDP-GlcNAcが重合に同時に要求された。活性は10 mM  $MnCl_2$ の存在下でpH 7.2のHepes緩衝液中で最適であり、他方、金属イオンを省くと、活性は検出されなかった。 $Mg^{2+}$ および $Co^{2+}$ は同様の濃度において $Mn^{2+}$ の～20%程度効果的であった。pmHASは同様の金属要件を有するが、他のHASは $Mg^{2+}$ を好む。

#### 【 0 1 0 3 】

組換えA98R酵素は、イン・ビトロで組換えspHASまたはDG42 x1HASによって合成されたHAのそれよりも小さい $3 \sim 6 \times 10^4$  Daの平均分子量を持つ多糖を合成した（各々、 $\sim 10^7$  Daおよび $\sim 5 - 8 \times 10^4$  Da；13、15）。該多糖はSpreptomyces hyaluronitricus HASリアーゼ（HAを脱重合する酵素によって完全に分解されたが、ヘパリンおよびコンドロイチンのような構造的に関連するグリコサミノグリカンによってはそうではなかった。

#### 【 0 1 0 4 】

PBCV-1感染クロレラ細胞はA98R遺伝子発現につき調べた。 $\sim 1,700$ ヌクレオチドA98R転写体は $\sim 15$ 分感染後に出現し、感染60分後に消失し、これはA98Rが初期遺伝子であることを示す。結果として、未感染およびPBCV-1感染クロレラ細胞からの膜画分は、HAS活性につき、感染後50および90分にアッセイした。未感染細胞ではなく感染細胞は活性を有した。細菌に由来する組換えA98R酵素のように、放射標識のUDP- $[^{14}C]$ GlcAから多糖への取り込みは、 $Mn^{2+}$ およびUDP-GlcNAcの双方に依存する。この放射標識生成物もまたHAリアーゼによって分解された。破壊されたPBCV-1ピリオンはHAS活性を有しなかった。

#### 【 0 1 0 5 】

高度に特異的な $^{125}I$ -標識HA-結合蛋白質を用い、PBCV-1感染クロレラ細胞をHA多糖につき分析した。感染後50および90分の細胞からの抽出物は、実質的量のHAは含有したが、未感染藻または破壊したPBCV-1ピリオンからの抽出物は含有しなかった。標識HA-結合蛋白質は感染後50および90分は無傷感染細胞と相互作用したが、健康な細胞は相互作用しなかった。従って、新たに合成されたHA多糖のかなりの部分が、感染藻の外方細胞表面で固



定化された。細胞外IIAは、ウイルスおよびその藻類宿主の間の相互作用でいずれの明白な役割も演じない。何故ならば、PBCV-1ブランクアッセイの頂部寒天中の精巢ヒアルロニダーゼ(465ユニット/ml)または遊離IIA多糖(100 $\mu$ g/ml)いずれかを含めることによって、ブランクサイズもブランク数も変化しなかったからである。

#### 【 0 1 0 6 】

また、PBCV-1ゲノムは、UDP-Glcデヒドロゲナーゼ(UDP-Glc-DH)およびグルタミン:フラクトース-6-リン酸アミノトランスフェラーゼ(GFAT)をコードするさらなる遺伝子を有する。UDP-Glc-DHはUDP-GlcをUDP-GlcA(HA生合成に必要な前駆体)に変換する。GFATはフラクトース-6-リン酸をグルコサミン-6-リン酸(UDP-GlcNAc代謝経路における中間体)に変換する。A98R-HASと同様に、これらのPBCV-1遺伝子は共に感染の初期に発現され、酵素的に活性な蛋白質をコードする。HA生合成経路における複数酵素の存在は、クロレラウイルスのライフサイクルにおける重要な機能として働くにちがいないことを示す。

#### 【 0 1 0 7 】

Streptococcus、脊椎動物、およびPBCV-1のHA合成は、同一の相対的順序で起こる2ないし4残基の多くのモチーフを保有する。これらの保存されたモチーフは、恐らくは、図2に示すようなHA生合成に非常に重要なドメインを反映する。グループC-scHAS、グループA-spHAS、ネズミHAS1、HAS2、HAS3およびカエルHASの蛋白質配列を図2に整列させて示す。図2の整列はDNASISマルチプル整列プログラムを用いて達成された。(示さないがヒトHAS1および2を含めた)他の公知のHASファミリーメンバーにおいて同一のscHAS中の残基は、シェーディングおよび星印によって示される。ドットによって示されるアミノ酸は、より大きな $\beta$ -グリコシルトランスフェラーゼファミリーの全てのメンバーで保存されている。菱形の記号は、酵素活性で臨界的であり得る高度に保存されたシステイン残基を示す。予測される膜ドメインMD1ないしMD7のほぼ中央点は矢印で示される。X1はXenopus laevisを示し、MMはMus musculusを示す。

## 【 0 1 0 8 】

H A S および DUP-糖前駆体から  $\beta$ -結合多糖を合成する他の酵素の間の同様の領域もまた、より多くのグリコシルトランスフェラーゼが配列決定されるに従って発見されつつある。例は、細菌セルラーゼシンターゼ、菌類および細菌キチンシンターゼ、および種々の H A S を含む。これらの同様の構造モチーフの重要性は、グリコシルトランスフェラーゼの三次元構造が蓄積されるに従ってより明らかとなるであろう。

## 【 0 1 0 9 】

図 3 は、公知のヒアルロナンシンターゼ間の革新的関係を示す。図 3 の系統樹は、D N A s i s マルチプル整列プログラムを用いてHiggins-Sharpアルゴリズムによって創製された。計算されたマッチングパーセンテージはデンドログラムの各バッチに示される。

## 【 0 1 1 0 】

本発明の D N A セグメントは生物学的機能同等 H A S 蛋白質およびペプチドを含む。このようなセグメントは、核酸配列およびこのようなコードされた蛋白質内で天然で起こることが知られているコドン縮重および機能的同等性の結果として生起し得る。別法として、機能的同等蛋白質またはペプチドは、組換え D N A 技術の適用を介して創製することができ、そこでは、蛋白質構造の変化は、交換すべきアミノ酸の特性の考慮に基づいて作成することができる。ヒトによって設計された変化は、部位特異的突然変異誘発技術の適用を介して導入することができ、例えば、酵素活性に対してまたは H A S 蛋白質の抗原性に対して改良を導入することができ、または分子レベルで H A シンターゼ活性を調べるために H A S 突然変異体をテストすることができる。

## 【 0 1 1 1 】

また、H A S コーディング配列に対する特異的変化の結果、修飾されたサイズ分布または構造的立体配置を有する H A の生産ができる。当業者であれば、異なるポリマーサイズおよび／または機能的能力を有するヒアルロン酸を生産できる改変されたヒアルロネートシンターゼを生産するように H A S コーディング配列を操作することができるのを認識するであろう。例えば、H A S コーディング配

列は、ヒアルロネートシンターゼが従前に取り込まれなかった糖または糖誘導体のような異なる構造を取り込む新しいヒアルロン酸を創製するように、改変された糖基質特異性を有する方法で改変することができる。この新しく取り込まれた糖の結果、異なる機能的特性を有する修飾されたヒアルロン酸、より小さいまたはより大きいポリマーサイズ／分子量を有するヒアルロン酸、あるいは双方が得られ得る。当業者に認識されるように、HASコーディング配列が与えられれば、これらの所望の特性および／またはサイズ修飾が達成できるように、変化および／または置換をHASコーディング配列になすことができる。表11は組換えseHASの糖ヌクレオチド特異性およびマグネシウムイオン要件をリストする。

【 0 1 1 2 】

【表2】

表II  
組換え seHAS の糖ヌクレオチド特異性  
およびマグネシウムイオン要件

存在する第2糖ヌクレオチド (μM)	HA合成*	
	UDP-[ <sup>14</sup> C]GlcA dpm (%)	UDP-[ <sup>3</sup> H]GlcNAc dpm (%)
無し	90(2.1%)	8(1.2%)
UDP-GlcNAc(300)	4134(100%)	—
UDP-GlcA(120)	—	635(100%)
UDP-Glc(160)	81(1.9%)	10(1.5%)
UDP-GalNAc(280)	74(1.7%)	19(2.9%)
UDP-GalA(150)	58(1.4%)	19(2.9%)
UDP-GlcNAc+EDTA	31(0.7%)	—
UDP-GlcA+EDTA	—	22(3.4%)

\*膜 (324 ng 蛋白質) は、120 μM UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA (2.8 × 10<sup>4</sup> dpm) または300 μM UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc (2 × 10<sup>4</sup> dpm) いずれかと共に37℃で1時間インキュベートした。放射標識糖ヌクレオチドは、示された第2非標識糖ヌクレオチドの存在下で使用した。HA合成活性は、本発明に記載したように測定した。

【 0 1 1 3 】

本明細書で用いる「修飾された構造」という用語は、天然に生じるHA多糖で

通常見出されない糖または誘導体を含有するヒアルロン酸ポリマーを示す。「変更されたサイズ分布」という用語は、天然酵素で通常見出されないサイズ分布のヒアルロン酸分子の合成をいい、作成されたサイズは正常よりもかなり小さいかまたは大きい。

【 0 1 1 4 】

異なるサイズの種々のヒアルロン酸生成物は、薬物送達領域で適用を有し、改変された構造の酵素の創製は異なるサイズのヒアルロン酸と組み合わせることができる。アンジオゲネシスおよび創傷治癒における適用は、もし約20の単糖が良好な量で作成することができるならば、潜在的に大きい。小ヒアルロン酸オリゴ糖のもう一つの特別の適用は、医療目的で使用される組換えヒト蛋白質の安定化におけるものである。このような蛋白質に関する主要な問題は、血液からのそのクリアランスおよび短い生物学的半減期である。この問題に対する一つの現在の解決は、蛋白質が循環から余りにも迅速に一部されるのを妨げる小分子保護をカップリングさせることである。非常に小さな分子量ヒアルロン酸はこの役割によく適合し、非免疫原性であって生体適合性であろう。薬物または蛋白質に付着したより大きな分子量のヒアルロン酸を用いて、ヒアルロン酸用のエンドサイトーシス受容体を有する網内皮細胞系を標的化することができる。

【 0 1 1 5 】

当業者であればこの開示が与えられれば、ヒアルロネートシンターゼによって作成されたヒアルロン酸ポリマーのサイズ分布を調整して異なるサイズを得るいくつかの方法があることを認識するであろう。まず、生成物サイズの反応速度制御は、温度を低下させ、酵素作用の時間を減少させ、1または双方の糖ヌクレオチド基質の濃度を減少させることによって改変することができる。これらの変数のいずれかまたは全てを減少させると、小量で小さなサイズのヒアルロン酸生成物を与えるであろう。これらのアプローチの不利は、生成物の収率もまた減少し、日によってまたバッチによって再現性を達成するのが困難であり得ることである。

【 0 1 1 6 】

第2に、大きなヒアルロン酸生成物を合成する酵素の固有の能力の改変である

。蛋白質に対する変化は、特異的アミノ酸の置換、欠失および付加（または代謝プロセッシングを介する補欠基の導入さえ）含めた組換えDNA技術によって作成することができる。固有により遅い酵素の結果となるこのような変化は、従って、反応速度手段によってヒアルロン酸サイズのより再現性のある制御を可能とする。最終的なヒアルロン酸サイズ分布は、配列中の特定のアミノ酸に頼る酵素のある種の特徴によって決定される。streptococcal酵素および真核生物ヒアルロネートシンターゼの間で絶対的に保存された残基の20%の中で、酵素が作成することができるヒアルロン酸ポリマーのサイズを制御し、それに大いに影響するユニークな位置におけるアミノ酸の組がある。これらの残基のいずれかにおける特異的变化は、修飾されたサイズ分布を有するHA生成物を生じる修飾されたHASを生じ得る。ヒアルロン酸が放出される前に酵素が作成することができるヒアルロン酸の固有のサイズを減少させるseHAS、spHAS、pmHASまたはcvHASに対する作成された変化は、天然酵素よりも小さいまたは潜在的に大きいサイズのヒアルロン酸生成物を生じさせる強力な手段を提供するであろう。

#### 【 0 1 1 7 】

最後に、作成されたより大きな分子量のヒアルロン酸は、特異的ヒアルロニダーゼによって分解されて、より小さな分子量のヒアルロン酸を作成する。しかしながら、この実施は再現性よく達成するのは非常に困難であり、細心にヒアルロン酸を再精製して、ヒアルロニダーゼおよび望まない消化産物を除去しなければならない。

#### 【 0 1 1 8 】

図4に示すように、ヒアルロナンシンターゼを作成して、特に、正常野生型酵素よりも小さな異なるサイズのヒアルロン酸ポリマーを生成させることができる。図は、その各々が、天然酵素から単一アミノ酸変化を有するように部位特異的突然変異誘発によって作成された、一連のspHAS酵素についての（ダルトン（分子量の尺度）の100万部での）HAサイズの分布を示す。各々は、アラニンで置き換えられた異なるシステイン残基を有する。塗りつぶしていない記号を持つ5つの曲線のクラスターは以下のspHAS蛋白質：野生型C124A、C261A、C366AおよびC402Aを表す。塗りつぶした丸は、部分的にのみ活性な

貧弱に発現されたC225A蛋白質を表す。

【 0 1 1 9 】

塗りつぶした三角はC289A spHAS蛋白質であり、これは、正常酵素または示された他の変異体よりもかなり小さな範囲のHAポリマーを合成することが判明した。この実施は、所望の範囲のHA生成物サイズを合成するヒアルロネートシンターゼ酵素を作成するのが可能であることを示す。ヒアルロネートシンターゼをコードするseHAS、pmHASおよびcvHAS遺伝子もまた部位特異的突然変異誘発によって操作して、所望の範囲のHA生成物サイズを合成する酵素を生じさせることもできる。

【 0 1 2 0 】

構造的に修飾されたヒアルロン酸は、所望のHASまたはspHASにおいて特定のアミノ酸を変化させることによって、ヒアルロン酸生成物のサイズ分布を改変することと概念的に異ならない。N-アセチル基が失われたDUP-GlcNであるか、もう1つの化学的に有用な基で置き換えられたDUP-GlcNAcの誘導体は特に有用であると予測される。強い基質特異性は、20%に保たれたもののうちアミノ酸の特異サブセットに頼らなければならない。1以上のこれらの残基に対する特異的变化は、天然酵素よりも1以上の基質と特異性低く相互作用する機能的シンターゼを創製する。従って、この改変された酵素は、以下の目的：(i) 一般的または標的化された薬物送達、放射線学手法等のための構造的に修飾されたヒアルロン酸へ特異的薬物、蛋白質またはトキシンを共有結合アップリングさせること、(ii) より強い物理的特性を持つゲルまた他の三次元生体材料を得るためのヒアルロン酸のまたは他の支持体への共有結合架橋、および(iii) 生体適合性フィルムまたは単層を生じさせるためのヒアルロン酸の表面への共有結合で化学者が異なる化学を使用するのを可能とするように設計された糖誘導体を取り込むために別の天然または特別の糖ヌクレオチドを利用することができる。

【 0 1 2 1 】

また、ヒアルロン酸を生成する細菌を作成することもできる。例えば、本発明者らは、spHAS遺伝子、ならびに糖ヌクレオチド前駆体の1つについての遺伝子を含むB. subtilisの株を創製した。本発明者らは、この細菌はヒト用途の

生成物の生産のためにバイオテクノロジー産業でしばしば使用されているので選択した。これらの細菌は、野生型天然株を用いて現在利用できるものよりも大量にヒアルロン酸を生産できる細菌の創製のための第1世代プロトタイプとして意図された。本発明者らは、これらの遺伝子の複数コピーを入れた。

# 【 0 1 2 2 】

例えば、3つの*Bacillus subtilis*株を構築して、ヒアルロナンシンターゼ (sPHAS) およびUDP-グルコースデヒドロゲナーゼのための*Streptococcus pyogenes*遺伝子の1つまたは双方を含有させ、その結果を表11-Bに示す。HAを検出し、定量する感受性の市販のラジオメトリックアッセイに基づいて、両遺伝子を持つ株 (株#3) はHAを作成し、培地に分泌すると判断された。親株またはデヒドロゲナーゼ遺伝子を丁度持つ株 (株#1) はHAを作成しない。sPHAS遺伝子単独を丁度含有する株#2はHAを作成するが、株#3が作成する10%に過ぎない。アガロースゲル電気泳動は、株#3によって培地に分泌されたHAが非常に高分子量であることを示した。

# 【 0 1 2 3 】

【表3】

表 11-B

株番号	細胞	培地 (*)	遺伝子を持つ株	細胞密度 (A <sub>600</sub> )
培地1ml当たりの $\mu$ g HA				
1	0	0	hasB	4.8
2	4	35	SpHAS	3.9
3	$\approx$ 10	>250	SpHAS+ hasB	3.2

(\*) ほとんどのHAは培地中にあるが、いくらかは細胞に会合していた；HAはPharmaciaからのHAテスト50キットを用いて測定した。

# 【 0 1 2 4 】

これらの実験は、蛋白質発現を駆動するのにこれらの遺伝子で通常見い出されるstreptococcalプロモーターを使用した。*B. subtilis*プロモーターの制御下

でspHASまたはscHASリーディングフレームを持つ株の構築は、より優れた結果さえ生じるであろうと予測される。使用するベクターは、*B. subtilis*中の中程度コピー数および（*B. subtilis*で $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ および大腸菌で $175 \mu\text{g}/\text{ml}$ までの耐性を可能とする）エリスロマイシン耐性についての遺伝子を有するグラム陽性／大腸菌シャトルベクターである。使用する*B. subtilis*宿主株はBGS Cからの1A1であり、これは、トリプトファン要件を有し、そうでなければ野生型であり、孢子形成できる。細胞増殖およびHA生産は、Spizizens最小培地＋トリプトファン、グルコース、微量元素およびエリスロマイシン（ $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）中であつた。増殖は、培地が消費されるまで（～36時間）激しく攪拌しつつ32℃であつた。

#### 【0125】

これは、通常はヒアルロン酸を作成しないであろうこれらのバイオ作成細胞が、spHAS遺伝子で形質転換するとそうするように競合するようになることを示す。また、spHASは、非ヒアルロン酸生産細菌に取り込まれて、ヒアルロン酸を生産できるバイオ作成細菌株を創製することもできる。

#### 【0126】

本発明の好ましい具体例は、配列番号：2のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む精製された組成物である。本明細書で用いる「精製された」という用語は、HAS蛋白質組成物をいうことが意図され、ここに、HAS蛋白質または（例えば、[HIS]<sub>3</sub>テイルを含有する）適当に修飾されたHAS蛋白質は、その天然に得られる状態に対して、すなわち、この場合は、原核生物細胞抽出物内のその純度に対して、いずれかの程度精製される。HAS蛋白質は、本開示に徴し、当業者に知られているように、*Streptococcus*、*Pasturella*、*chlorella*ウイルス、患者検体、組換え細胞、感染組織、細胞外マトリックス中に高レベルのヒアルロネートを含有する組織の単離された重集団から単離することができる。例えば、組換えsellASまたはspHAS蛋白質は大腸菌の全膜蛋白質のほぼ10%を占める。従って、精製されたHAS蛋白質組成物は、それが天然で起こり得る環境から遊離された配列番号：2のアミノ酸配列を有するポリペプチドともいう（図5）。



## 【 0 1 2 7 】

ゲノムDNAまたはcDNAからのものであるかに拘わらず、scHASの発現に転じると、HAS蛋白質の組換え調製のために発現系を調製するよう進めることができる。原核生物または真核生物系における発現用のDNAセグメントの作成は、組換え発現における当業者に一般的に知られている技術によって行うことができる。

## 【 0 1 2 8 】

HASは、真核生物発現系で首尾よく発現させることができるが、本発明者らは、細菌発現系を全ての目的でHASの調製で使用できると断言する。細菌発現は結局は使用の容易性、生産コスト、およびそれにより得られる物質の質の点で真核生物発現よりも利点を有するであろう。

## 【 0 1 2 9 】

streptococcalヒアルロナンシンターゼ (seHASおよびspHAS) の精製は表1 I I および図6に示す。精製スキームの種々の段階からの画分を12.5%ゲル上のSDS-PAGEによって分析し、これを次いでクーマシーブリリアントブルーR-250で染色した。レーン：分子量マーカー；1、組換えseHAS-116を含有する全大腸菌膜；2、膜の洗剤可溶化後の不溶性画分；3、洗剤可溶化画分；4、Ni-NTAクロマトグラフィー樹脂からのフロースルー；5-9、カラムの5つの順次の洗浄（各々、2カラム容量）；10、単一バンドである溶出した純粋なHASシンターゼ。

## 【 0 1 3 0 】

【表4】

表 III

工程	全タンパク ( $\mu$ g)	特異的活性 (nmol/ $\mu$ g/hr.)	全活性 (nmol UDP-GlcA)	収率 (%)	精製 (一倍)
膜	3690	1.0	3649	100	1.0
抽出物	2128	2.2	4725	129	2.2
アフィニティ ーカラム	39	13	500	14	13.1

## 【0131】

IIASをコードするDNAセグメントでの宿主細胞の形質転換は、IIAS蛋白質を得るための便宜な手段を提供するであろうと提案される。また、cDNA、ゲノム配列、およびその組合せは、宿主細胞が勿論蛋白質への翻訳のための機能的mRNAを生じさせるためのゲノム転写体を保有するので、真核生物発現に適する。

## 【0132】

本発明のもう1つの具体例は、配列番号：2の、または保存されたもしくは半保存アミノ酸変化を持つ機能的に同様のアミノ酸配列を含む蛋白質をコードするベクターを含む組換え宿主細胞を増殖させることを特徴とする蛋白質組成物を調製する方法である。核酸発現および蛋白質生産、続いてこのような生産された蛋白質の回収を可能とする条件下で宿主細胞を増殖させる。宿主細胞を含めたHASおよび結局はIIAの生産、核酸発現、蛋白質生産および回収を可能とする条件は、scHAS遺伝子、およびseHAS遺伝子蛋白質産物HASの本開示に徴し、および本明細書に記載された方法によって、当業者に知られている。

## 【0133】

ヒアルロン酸の発現用の好ましい宿主は、*S. equisimilis*および*Streptococcus*種の他の適当なメンバーのような原核生物である。しかしながら、IIAは、*Bacillus*、*Enterococcus*、または*Escherichia*属さえの種メンバーのような、組換えIIAシンターゼを発現する異種宿主細胞によって合成することができることも知られている。本発明のIIAシンターゼの発現用の最も好ましい宿主は、*Lactococ*

cus種、*Bacillus subtilis*または大腸菌のような、本発明のHAS遺伝子で形質転換した細菌である。

#### 【 0 1 3 4 】

ほとんどいずれの真核生物発現系も、例えば、バクロウイルスーベースの、ジルタミンシンターゼーベースの、ジヒドロ葉酸レダクターゼーベースの系、SV-40ベースの、アデノウイルスーベースの、サイトメガロウイルスーベースの、酵母ベースのもの等、HASの発現で用いることができると同様に考えられる。このような発現では、コーディング配列をプロモーターに隣接させ、その制御下に置くであろう。コーディング配列をこのようなプロモーターの制御下とするには、蛋白質の転写リーディングフレームの転写開始部位の5'末端を選択されたプロモーターから「下流」（すなわち、3'側）約1および約50ヌクレオチドの間に位置させると当該分野で理解されている。また、pYES2のような*Saccharomyces cerevisiae*酵母発現ベクター系は、図7に示すように、GALプロモーターの制御下でHASを生産するであろう。図7は、spHAS酵素がpYES2プラスミドを用いて組換え酵母で生産されたことを示す。UDP-GlcAおよびUDP-GlcNAcを供給すると、該酵素は高分子量HAを作成する。

#### 【 0 1 3 5 】

真核生物発現を考える場合、もしそれが元のクローン化セグメントに含まれていないならば、HAS遺伝子またはDNA、適当なポリアデニル化部位（例えば、5'-AATAAA-3'）を含む転写単位に組み込むことが典型的には望まれるであろう。典型的には、ポリA付加部位は、転写終止に先立つ位置の終止部位から「下流」約30ないし2000ヌクレオチドに置かれる。

#### 【 0 1 3 6 】

実質的にいずれの通常使用される宿主細胞も、ここにHASの発現と組み合わせて使用することができると考えられる。本発明のHAS cDNAのための好ましい細胞系の例は、239、AtT-20、HepG2、VERO、HcLa、CHO、WI-38、BHK、COS-7、RINおよびMDCK細胞系のような真核生物発現で典型的には使用される細胞系を含む。これは、一般に、HAS酵素をコードする組換えDNAセグメントを担持し、該酵素を発現できる組換

え宿主を生産し；クローン化H A S遺伝子またはc D N Aの転写、および適当にはヒアルロン酸の生産を可能とする条件下、組換え宿主を培地中で培養し、組換え宿主からのH A S酵素または分泌されたヒアルロン酸を精製する工程を含む。

【 0 1 3 7 】

一般に、クローン化H A S遺伝子またはc D N Aの発現に適した条件は、プロモーター、ベクター、および使用される宿主系に依存する。例えば、l a cプロモーターを用いる場合、イソプロピルチオガラクトシドのような、l a c転写を刺激するであろう物質を含めることを通じて転写を誘導することが望まれるであろう。例えば、本発明のクローン化seHAS遺伝子は、図5に示すように、大腸菌中でH I S含有蛋白質として発現される。他のプロモーターが使用される場合、転写を誘導し、またはそうでなければそれを上昇調節するには、異なる物質が必要であり得る。

【 0 1 3 8 】

図5は、大腸菌における組換えseHASおよびspHASの共発現を示す。還元条件下で、10% (w/v) ゲルを用いるS D S - P A G Eによって、膜蛋白質（レーン当たり5 m g）を分画した。ゲルをクーマシーブルーR - 2 5 0で染色し、写真を取り、スキャンし、Molecular Dynamicsパーソナルデンストメーター（モデルP D S 1 - P 6 0）を用いて定量した。H A シンターゼの部分は矢印によってマークされる。レーンAは天然spHASであり（グループA）；レーンCは天然seHASであり；レーンEは組換えseHASであり；レーンPは組換えspHASであり；レーンVはベクター単独である。使用した標準はB i o - r a d低分子量であり、k D aで示す。

【 0 1 3 9 】

シンターゼの発現を得るに加えて、好ましくは、糖ヌクレオチド前駆体の生合成に必要な酵素をコードする適当な遺伝子を含めることによって、あるいはN - アセチルグルコサミンまたはグルコサミン（GlcNAcまたはGlcNH<sub>2</sub>）およびグルコース（Glc）のような前駆体供給酵素のための基質を含有する増殖培地を用いることによって、H A合成に誘導する環境を供することが望まれる。

【 0 1 4 0 】

さらに、酵素によって合成された生成物が培地中で分解しないように、酵素ヒアルロニダーゼを欠く宿主に遺伝子を組み込むことが望まれる。さらに、宿主は、HAの生産を最適化するように選択されるであろう。例えば、適当な宿主は、大量の糖ヌクレオチド前駆体を生産して、HAS酵素を支持し、それが大量のHSを生産するようにするものである。このような宿主は天然に見出すことができるか、あるいは突然変異誘発または組換えDNA技術を含めた種々の技術によって作成することができる。糖ヌクレオチド合成酵素、特に、UDP-HicAを生産するのに必要なUDP-Glcデヒドロゲナーゼについての遺伝子を単離し、HAS遺伝子またはcDNAと共にベクターに組み込むこともできる。本発明の好ましい具体例は、これらの補助的組換え遺伝子またはcDNAを含有する宿主であり、これらの遺伝子産物の増幅は、それにより、HAの増大された生産を可能とする。

#### 【 0 1 4 1 】

宿主細胞を培養するのに使用される手段は、特に臨界的であるとは考えられない。有用な詳細については、米国特許第4,517,295号；第4,801,539号；第4,784,990号；または第4,780,414号が引用され、出典明示して全部をここに含ませることとする。*S. equisimilis*のような原核細胞宿主を使用する場合、CO<sub>2</sub>リッチのプロス増殖培地中、嫌気性条件下で、細菌の発酵を使用することが望まれる。これは、好気性条件下よりも大きいHAの生産を可能とする。もう一つの考慮は、嫌氣的に増殖したstreptococcus細胞は発熱性エキソトキシンを生成しないということである。適当な増殖条件は、本開示に徴して、当業者に知られているように、他の原核生物宿主で慣用化することができる。

#### 【 0 1 4 2 】

一旦適当な宿主が構築され、HAの生産に適した条件下で培養すれば、このような生産されたHAを分離することが望まれる。典型的には、分泌されるか、そうでなければ、組換え生物によって周囲の培地に放出され、公知の技術によって培地からのHAの容易な単離を可能とする。例えば、濾過によって、およびエタノールのようなアルコールによる沈殿によっての培地からの分離と組み合わせて

、H Aを細胞および夾雑物から分離することができる。他の沈殿剤は、アセトンのような有機溶媒または塩化セチルピリジニウム（C P C）のような第四級有機アンモニウム塩を含む。

#### 【 0 1 4 3 】

H Aの単離のための好ましい技術は、ここに出典明示して本明細書の一部とみなす米国特許第4, 517, 295号に記載されており、そこでは、発酵の最後に有機カルボン酸、トリクロロ酢酸を細菌懸濁液に添加する。トリクロロ酢酸は細菌細胞が凝集し、死滅することを引き起こし、H A（所望の生成物）からこれらの細胞および関連夾雑物を分離するのを容易とする。清澄化された上清を濃縮し、透析して、有機酸を含有する低分子量汚染物を除去する。前記手法は、0.22  $\mu$ mポアサイズのフィルターを含有するフィルターカセットを通す濾過を利用する。溶液の導電率がほぼ0.5メガオームまで低下するまで透析濾過を継続する。

#### 【 0 1 4 4 】

濃縮されたH Aは、過剰の試薬エタノールまたは他の有機溶媒を添加することによって沈殿させ、次いで、沈殿したH Aは、エタノールで洗浄することによって乾燥し、真空乾燥し、凍結乾燥してアルコールを除去する。次いで、H Aをホウ酸緩衝液pH 8に再溶解させ、4℃にて、C P CまたはC E T A B、混合臭化トリメチルアンモニウム溶液のようなある種の他の有機アンモニウム塩で沈殿させる。引用した前記引用特許にさらに記載されているように、沈殿したH Aを粗い濾過によって回収し、1 M N a C lに再懸濁し、透析濾過し、濃縮する。得られたH Aを濾過滅菌し、所望の目的用途に応じて、適当な塩、乾燥粉末または滅菌溶液に容易に変換される。

#### 【 0 1 4 5 】

##### A. 代表的な使用可能な遺伝子工学手法

優れた細胞膜バリアの無い細胞が宿主細胞として用いられた場合、トランスフェクションは、当業者に良く知られているリン酸カルシウム沈殿法により行われる。しかしながら、核注入、カチオン脂質、エレクトロポレーション、プロトプラスト融合、もしくはデュポン社により開発されたバイオリスティックバイオバ

ーティクルデリバリシステム(Biolistic<sup>®</sup> Bioparticle delivery system, 1989)による方法などの他の方法もまた、DNAを細胞内に導入するために用いられた。デュボンシステムを用いる利点は、高い形質転換効率である。原核細胞、もしくは実質的な細胞壁構造を含む細胞が用いられた場合、好ましいトランスフェクションの方法は、受容能もしくはエレクトロポレーションを誘発するために塩化カルシウムを用いたカルシウム処理である。

【 0 1 4 6 】

所望のコーディングもしくは制御配列を含む好ましいベクターの構築は、標準的なライゲーション技術が用いられた。単離されたプラスミドもしくはDNAフラグメントが、要求されるプラスミドを構築するために必要な形状に、開裂され、調整され、再結合された。開裂は、好ましいバッファー内で制限酵素を用いて処理することにより行われる。一般に、約1  $\mu$ gのプラスミドもしくはDNAフラグメントが、約20  $\mu$ lのバッファー溶液中における約1ユニットの酵素と共に用いられる。特定の制限酵素のための好ましいバッファーおよび基質の量は、製造業者により特定される。約1時間のインキュベーション時間により行われる。

【 0 1 4 7 】

インキュベーションの後、タンパクはフェノールおよびクロロホルムにより抽出されることにより除去される。そして、核酸はエタノールでの析出により水分画から回収される。平滑末端が必要とされる場合、試料は、10ユニットのポリメラーゼ I (Klenow)と共に15分間15℃で処理され、フェノール-クロロホルムで抽出され、そしてエタノールで析出される。ライゲーションのために、約等モル量の所望の成分、好ましくは正確な適合をもたらすために末端に調整された成分が、0.5  $\mu$ gのDNA当たり約10ユニットのT4 DNAリガーゼで処理される。開裂されたベクターが成分として用いられる場合は、細菌性アルカリフォスファターゼにより開裂されたベクターの再結合を防止することが望ましい。

【 0 1 4 8 】

構築されたプラスミド内の機能的な配列の確認のための分析のため、第1ステップは、30～32℃での形質転換を行うことにより、特定成分であるE. coli

SURE細胞(Stratagene)内にクローニングすることにより、プラスミドDNAを増殖させることである。次に、組み換えプラスミドは、UDP-GlcA前駆体を産生することができるE. coli K5株 Bi8337-41にトランスフォームされ、そして良好な形質転換体が抗生物質耐性により好適なものとして選択される。次いで、プラスミドは、形質転換体のライブラリーから、HAの産生を示す細菌のコロニーによりスクリーニングされる。これらのコロニーは、選り取られ、増殖され、そしてプラスミドを分離し、制限酵素地図により分析される。次いで、機能性HAS遺伝子の兆候を示すプラスミドは、当業者に良く知られている配列分析技術の幾種類かにより特徴付けられる。

#### 【 0 1 4 9 】

##### B. 起源、宿主細胞培養、およびベクター類

一般に、原核生物は、DNA配列の初期のクローニング、および本発明に有用なベクターの構築のために用いられる。好ましい起源はグラム陽性細胞、特にグループCのStreptococcal株から誘導されたものが好ましいと思われる。例えば、StaphylococciおよびStreptococciといった単一膜であるが厚い細胞壁の細菌は、グラム陽性菌である。E. coliのようなグラム陰性菌は、細胞を取り囲む膜より、むしろ二つの個別の膜を有する。グラム陰性生物は、より薄い細胞壁を有する傾向にある。グラム陽性生物の単一膜は、グラム陰性細菌の内部の原形質膜に類似する。好ましい宿主細胞は、Streptococcus株であり、これはヒアルロニダーゼ陰性もしくは他の抑制となるように変異される(EP144019, EP266578, EP244757)。特に有用なStreptococcus株としては、S. equisimilisおよびS. zooepidemicusである。

#### 【 0 1 5 0 】

原核生物は、また発現体のためにも用いられる。高分子量HAシンターゼに適合するのに最も適当な形状においてHAシンターゼを発現するために、S. equisimilisもしくはS. zooepidemicusといったStreptococcus種を用いることが望まれる。上述した株は、E. coli W3110(F<sup>-</sup>、ラムダ<sup>+</sup>、原栄養性、ATCC No. 273325)、Bacillus subtilisといったバチルス、もしくは、Serratia marcescensといった他の腸内細菌と同様に、「超」HAS含有宿主を発生するために用いること



ができる。

【 0 1 5 1 】

一般に、宿主細胞と適合性のある種から導かれた複製および制御配列の起源を含むプラスミドベクターは、これらの宿主と関連して用いられる。形質転換された細胞において表現型の選択を導くことが可能であるマーキング配列と同様に、通常、ベクターは複製の開始点に運搬される。例えば、*E. coli*は、代表的には*E. coli*種から導かれるプラスミドであるpBR322を用いて形質転換される。pBR322は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含み、よって形質転換された細胞の特定のために容易な手段を提供する。pBRプラスミドもしくはpUCプラスミド、または他の微生物プラスミドもしくはファージもまた、それ自身のタンパクの発現のための微生物組織により用いられることができるプロモータ類を含む、もしくは含むように修正される必要がある。

【 0 1 5 2 】

最も一般的に組み換えDNA構築物に用いられるそれらのプロモータは、*lacZ*プロモータ、*lac*プロモータ、T7バクテリオファージプロモータ、およびトリプトファン(*trp*)プロモータシステムを含むものである。これらは最も一般的に用いられるものであると同時に、他の微生物プロモータが発見され、用いられている。そしてそれらの核酸配列に関する詳細は公開されており、機能的にプラスミドベクターとそれらを連結することは当業者であれば可能である。本発明を用いる場合にも、統合されたベクターを用いることができる。

【 0 1 5 3 】

原核生物に加えて、例えば酵母培養物等の真核微生物もまた用いることができる。他の多くの株が一般に利用可能であるにもかかわらず、*Saccharomyces cerevisiae*もしくは通常のパン屋の酵母が真核微生物の中でも最も一般的に用いられる。*Saccharomyces*における発現のために、例えばプラスミドYRp 7が通常用いられる。例えばATCC No. 44076もしくはPEP4-1のようなトリプトファン無しでは成育する可能性を欠く酵母の変異株のための選択マーカーとして提供される*trp1*遺伝子を、このプラスミドは既に含んでいる。そして、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としての*trp1*領域の存在は、トリプトファンの欠乏における成育により、形質

転換の検出のために効果的な環境を提供した。酵母ベクターにおいて好適なプロモータ配列は、ガラクトース利用遺伝子のためのプロモータ、3-フォスfogリセレートカイネース、もしくは、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスフォフルクトキナーゼ、グルコース-6-フォスフェートイソメラーゼ、3-フォスfogリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼといった他の解糖酵素のためのプロモータを含むものである。

#### 【 0 1 5 4 】

構築する際に好適な発現プラスミドにおいて、これらの遺伝子に連結する終止配列は、mRNAのポリアデニレーションおよび終止を提供するために、発現されることが望まれる配列の発現ベクターの3'側に連結される。成育条件により制御される転写のさらなる利点を有する、他のプロモータとしては、アルコールデヒドロゲナーゼ2、チトクロームC、アシドフォスファターゼ、窒素代謝を助ける分解性酵素、および上述したグリセラルデハイド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ、およびマルトースおよびガラクトースを利用するために必要な酵素等のためのプロモータ領域である。酵素適用性のプロモータ、反復領域のオリジン、および終止配列を含むいかなるプラスミドベクターも好適である。

#### 【 0 1 5 5 】

微生物に加えて、多細胞生物から誘導された細胞の培養物も宿主として用いることができる。原則的に、脊椎動物であるか非脊椎動物の培養物であるかにかかわらず、いかなるこのような細胞培養物は機能する。しかしながら、脊椎動物細胞に対する関心が最も高く、また培養における脊椎動物細胞の増殖は近年においてルーチン作業となっている。このような有用な宿主細胞系統は、VEROおよびHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系統、およびWI38、BHK、COS、およびMDCK細胞系統である。

#### 【 0 1 5 6 】

哺乳類の細胞を用いるため、発現ベクターにおける制御機能が、しばしばウィルス材料により提供される。例えば、一般的に用いられているプロモータは、ポ

リローマ、アデノウイルス2、ウシ乳頭腫ウイルス、および最も頻繁にはシミアンウイルス40から誘導される。SV40ウイルスの初期のもしくは最近のプロモータは、両者がSV40のウイルスの複製の開始点をも含むフラグメントとしてウイルスから容易に得られることから、特に有用である。より小さい、もしくはより大きいSV40のフラグメントもまた用いられ、ウイルスの複製の開始点において位置するBgl I サイトに対するHind III サイトから延びる約250bp配列を含むものとして提供される。

#### 【0157】

さらに、所望の遺伝子配列と正常に連結されるプロモータもしくは制御配列を用いることが可能であり、しばしば望ましい。このような制御配列は、宿主細胞系に適合するものとして提供される。複製の開始点は、例えばSV40もしくは他のウイルス（例えば、ポリローマ、アデノ、BPV）源から誘導された、外因性の開始点を含むベクターの構築物、もしくは宿主細胞の染色体複製の機構により提供されるもののいずれかにより提供されてもよい。ベクターが宿主細胞の染色体内に一体化された場合は、後者の機構でしばしば十分とされる。

#### 【0158】

C. グループCの*Streptococcus equisimilis*の高カプセル化された株からの真正HAシンターゼの単離

コードされたタンパク、指定されたseHASは、417アミノ酸（算出された分子量：47,778、およびPI：9.1）、であり、いままで確認されたHASファミリーの中で最も小さいメンバーである（図2）。seHASは、またSDS-PAGE(Mr-42 kDa)において、異常に速く移動した(図5および8)。

#### 【0159】

図8は、組換えseHASの特定の抗体を用いたウェスタンブロット分析をグラフに示したものである。組換えseHAS（E；レーン2、7、および9）もしくはpHAS（P；レーン3、6、8、および10）を含む、グループC（C；レーン1）もしくはグループA（A；レーン4）のストレプトコッカス膜およびE. coli 膜（9mg/レーン）は、還元SDS-PAGEおよびニトロセルロースへのエレクトロトランスファにより分画された。ニトロセルロースのストリップは、プローブとさ

れ、以下のspHAS領域に生じた精製IgG分画を用いたアプリケーションにおいて描写されたものとして現像された。中央ドメインペプチドE<sup>111</sup>-T<sup>111</sup>（レーン1-4）；C-末端ペプチド（レーン5-6）；完全タンパク（レーン7および8）；組換え中央ドメイン（レーン9および10）。非免疫IgGもしくはベクターだけで形質転換された細胞からの膜は、レーン5におけるようにステインが得られなかった。

#### 【 0 1 6 0 】

seHASおよびspHASタンパク（以前、米国出願第08/899,940号において確認された。）をコードする配列は、72%同一であった。seHASの推定されるタンパク配列は、合成タンパク抗体との反応性により確認された(図8)。E. coli内で発現された組換えseHASは、主たるタンパクとして膜内で回収され(図8)、インビトロでUDP-GlcNAcおよびUDP-GlcAの存在下、非常に大きな分子量のHAを合成した(図9)。

#### 【 0 1 6 1 】

図9は、seHASおよびspHASにより産生されたHAのサイズの分布の反応速度分析を示す。同じ量のseHASもしくはspHASタンパクを含有するE. coli膜は、アプリケーションに記載されたように、37℃で1.35mMのUDP-[<sup>14</sup>C]GlcA ( $1.3 \times 10^4$  dpm/nmol) および3.0mMのUDP-GlcNAcと共に培養された。これらの基質濃度は、それぞれのKm値の15倍より大きいものである。0.5、1.0、および60分経過の試料はSDSで処理され、Sepharose 400 HRでクロマトグラフィーされた。HAタンパクは、カラムの分画範囲（分画12-24）内のHAタンパクは、各分画内の全HAのパーセントで標準化された。表の上の矢印の上の値は、ダウンマルチアングルレーザー光スキャタリング装置(Wyatt Technology Corp.)を用いた別の実験において直接決定されたHAの分子量(100万単位)である。seHASにより(黒丸、黒四角、および黒三角)およびspHAS(白丸、白三角、 )により、0.5分(白丸、黒丸)、1.0分(白四角、黒四角)および60分( 、黒三角)で合成されたHAのサイズの分布が、表示されるように示されている。seHASおよびspHASは、合成するHA鎖の大きさの分布において本質的に等しいことが分析で示された。seHASは、HA産生の機能において、spHASの2

倍の速さである。

#### 【 0 1 6 2 】

##### C. 1 細菌株およびベクター

ムコイドグループC株D181; (*Streptococcus equisimilis*)は、ロックフェラー大学コレクションから入手した。E. coli宿主株SureおよびXL1 Blue MRF'は、Stratageneから、Top10 F'株はInvitrogenからのものである。他に注釈が無い限り、*Streptococci*はTHY内で培養し、E. coliは株はLB培地で培養された。PKK-223発現ベクターは、Pharmaciaから、PCR2.1クローニングベクターはInvitrogenからのものである。そして、前消化されたλ Zap<sup>TM</sup> Bam HI/CIAPベクターは、Stratageneからのものである。

#### 【 0 1 6 3 】

##### C. 2 組換えDNAおよびクローニング

CaparonおよびScottの方法（当業者において公知）により単離された*Streptococcus equisimilis*からの高分子質量のゲノムDNAは、Sau3A1で平均サイズが2～12 k Bに部分消化された。消化されたDNAは、エタノールで沈殿され、洗浄され、Bam HI/CIAPλ Zap 発現ベクターに連結された。連結されたDNAは、Promegaから入手したPackagene<sup>TM</sup>抽出物と共にファージ内に収容された。収納されたファージライブラリの力価は、宿主としてのXL1-Blue MRF' E. coliを用いてチェックした。

#### 【 0 1 6 4 】

##### C. 3 デイジェネレートPCR増幅

デイジェネレートオリゴヌクレオチドは、spHAS (*Streptococcus pyogenes*)、D G42 (*Xenopus laevis* HAS; 19)およびnodC (*Rhizobium meliloti* nodulation 因子)の中の保存された配列を基礎として設計され、鋳型としてのD181ゲノムDNAと共にPCR増幅のために用いた。増幅の条件は、34サイクルで、94℃1分間、44℃1分間、72℃1.5分間であり、その後、72℃10分間で最後の伸長とした。オリゴヌクレオチドHADR F1, 5'-GAY MGA YRT YTX ACX AAT TAY GC T ATH GAY TTR GG-3'（配列番号20；センスストランド）は、配列D<sup>233</sup>RCL TNYAIDL（配列番号9；spHAS）に相当する。オリゴヌクレオチドHACTR1, 5'-

ACC WGT WCC CCA NTC XGY ATT TTT NAD XGT RCA-3' (配列番号21; アンチセンスストランド) は、領域C<sup>6</sup>' TIKNTEWGTR (配列番号10; spHAS) に相当する。いくつかの位置における塩基の縮退は、表IVに列記する、縮退塩基のためのコードにおいて、IUPACにより採用された標準名称により示されている。

【0165】

【表5】

表IV  
IUPAC コード-縮退塩基

国際純正・応用化学連合 (IUPAC)) は、縮退塩基類のために標準単一文字表示を確立した。

B	=	C+G+T
D	=	A+G+T
H	=	A+C+T
K	=	T+G
M	=	A+C
N	=	A+C+G+T
R	=	A+G
S	=	G+C
W	=	A+T
V	=	A+C+G
X	=	微量塩基類 (他で特定される。)
Y	=	C+T

【0166】

これら二つのオリゴヌクレオチドは459bp PCR産物を提供した。それはアガロースゲル上で分離され、そしてBI0-101 GeneCleanキットを用いて精製された。次いで、このフラグメントは、製造者の指示にしたがって、宿主としてTOP10F<sup>+</sup>細胞を用い、PCR2.1ベクター内にクローニングされた。ダブルストランドプラスミドDNAは、QIAfilterプラスミドMidiキット(Qiagen)を用いてE. coli (TOP10 F<sup>+</sup>)から単離された。以下に示す二つの他の縮退センスプライマーもまた合成された。HAYAF1, 5'-GTN GCT GCT GTW RTX CCW WSX TWT AAY GAR GA-3' (配列番号22、spHASの領域V<sup>6</sup>' AAVIPSYNE (配列番号11) に相当) およびHAY

DF1、5'-GTX RWT GAY GGN WSX WSN RAX CAT GAX GC-3' (配列番号23、spHASのV<sup>1.0</sup>"DDGSSNTD (配列番号12) を基礎とする)。二つの固有のアンチセンスプライマーが459bpのPCR産物の配列を基礎として合成された。これらは以下の通りである。D181.2、5'-GAA GGA CTT GTT CCA GCG GT-3' (配列番号13) およびD181.4、5'-TGA ATG TTC CGA CAC AGC GC-3' (配列番号14)。D181ゲノムDNAを増幅するためにD181.2もしくはD181.4のいずれかと共に用いられた場合、二つの縮退センスプライマーの各々は、予想されるサイズのPCR産物を与えた。四つのPCR産物はクローニングされ、上記と同様のストラテジを用いて配列決定された。各PCR産物のために、6つの異なるクローンから入手した配列は、共通塩基配列を得るために比較された。したがって、我々は、spHASと高いホモロジーを有する連続ORFと共に1042bpの配列を入手した。

#### 【0167】

##### C. 4 ライブラリスクリーニング

二つの分子プローブはライブラリをスクリーニングするために用いられた。クローニングされた459bpのPCR産物と、オリゴヌクレオチドD181.5 (5'-GCTTGATAGGTCACCAAGTGTCACG-3' (配列番号15) ; 1042bp配列から誘導されたもの) である。459bpのPCR産物は、Prime-It IIランダムプライマー標識キット(Stratagene)を用い、製造者の指示にしたがって、放射線標識を行った。オリゴヌクレオチドは、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPを用い、Kinase-It Kinasing Kit(Stratagene)により標識した。放射線標識された産物は、NucTrap Pushカラム(Stratagene)において非標識物から分離された。オリゴプローブは、サザンブロット上でのD181ゲノム消化物と特異的にハイブリダイズされた。入フェージライブラリをスクリーニングするために、吸着されたフェージを含むニトロセルロース膜上の宿主 (3000ブラック/プレート) が、60℃でブレハイブリダイズされ、そして5'末端を標識されたオリゴヌクレオチドD181.5と、QuikHyb Hybridization溶液(Stratagene)中、80℃で指示にしたがってハイブリダイズされる際に、XLBLUE MRP'は用いられた。

#### 【0168】

次いで、膜は、室温で15分間、2x SSCバッファーおよび0.1%(w/v)SDSを用い

て洗浄され、60℃で30分間、0.1x SSCバッファーおよび0.1%(w/v) SDSを用いて洗浄され、乾燥され、そして-70℃で一夜、Bio-Max MSフィルムにさらされた。陽性のプラークは、リプレートされ、そして2度再スクリーニングされた。純粋な陽性のファージは、クロロホルムと共にSMバッファー内に貯蔵された。ベクタープライマーと共にこれらのファージにおけるPCRは、3つの異なる導入物サイズを明らかにした。

#### 【 0 1 6 9 】

ベクタープライマーとクローニングされた1042bpの配列の異なる領域からのプライマーとの組み合わせでのPCRは、3つの異なるファージの内の一つだけが、完全なHAS遺伝子を有することを明らかにした。このファージ中の導入物サイズは、6.5kbであった。プラスミド内への導入物のサブクローニングの試みは、クローニングが失敗した選択されたファージライブラリからの自動的な切除によりなされた。したがって、PCRストラテジは、ORFの5'および3'末端を得るために、純粋な陽性ファージDNAにおいて再度適用された。オリゴヌクレオチドプライマーD181.3(5'-GCCCTGTGTCGGAACATTCA-3' (配列番号16))およびT3(ベクタープライマー)は、3kbの産物を増幅し、そしてオリゴヌクレオチドD181.5およびT7(ベクタープライマー)は2.5bpの産物を増幅した。ORFの5'および3'末端配列は、これら二つの上記産物を配列決定することにより得られた。全てのPCR産物の配列の分析は、1254bpのseHAS遺伝子のORFを再構築することを可能とした。

#### 【 0 1 7 0 】

##### C. 5 seHASの発現クローニング

プライマー類は、センスオリゴヌクレオチドにおけるEcoRI制限サイト(5'-AGGATCCGAATTCATCAGAACATTAAAAACCTC-3' (配列番号17))、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドにおけるPstIサイト(5'-AGAATTCTGCAGTTATAATAATTTTTTACGTGT-3' (配列番号18))を含むために、seHASの開始および終止コドンで設計された。これらのプライマーは、純粋なハイブリダイゼーション陽性のファージと同様に、D181ゲノムDNAからの1.2kbPCR産物を増幅した。この1.2kb産物は、アガロースゲル電気泳動により精製され、PstIおよびEcoRIで消化され、PstI



ーおよびEcoRIーで消化されたpKK223ベクター内に、指向的にクローニングされた。ライゲートされたベクターは、E. coli SURE細胞内に導入され、そして30度で培養された。このステップは、実際には重要である。なぜなら、他の宿主細胞もしくはより高い温度ではクローニングされた導入物が削除されてしまうからである。コロニーは単離され、そのpDNAは精製された。6つのコロニー(a, b, c, d, e, およびfとする)の内、5つが正しいサイズの挿入物を有したが、一つは挿入物がなかった。

#### 【 0 1 7 1 】

##### C. 6 H A シンターゼ活性

H A シンターゼ活性は、5つの上記クローンから調製された膜においてアッセイされた。新鮮なログフェイズ細胞が3000g採取され、4℃でPBSにより洗浄され、そして膜は当業者において良く知られているプロトプラスト法を修正した方法により単離された。Streptococcus pyogenesおよび Streptococcus equismilisからの膜の調製もまた、異なるプロトプラスト手順の修正した方法により入手された。膜は、37℃で、50mMリン酸ナトリウムおよびカリウム、20mMのMgCl<sub>2</sub>でpH7.0、1mMDTE、120μMUDP-GlcAおよび300μMUDP-GlcNAc中で、培養された。糖質の含有は、UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA(318mCi/mmol; ICN)および/またはUDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc(29.2Ci/mmol NEN)を用いることによりモニターされた。反応は、最終濃度が2%(w/v)までのSDSの添加により終了させた。産物のH Aは、下降流ペーパークロマトグラフィにより前駆体から分離され、起源において含まれる放射線活性を検出することにより測定される。

#### 【 0 1 7 2 】

##### C. 7 ゲル濾過分析

組換えscHASもしくはspHASを含む膜によりインビトロで産生された、放射線標識されたH Aは、Sephacryl S500 HR(Pharmacia Biotech Inc.)のカラム(0.9×40cm)によるクロマトグラフィによって分析された。試料(200mM NaCl, 5mM Tris-HCl, pH 8.0, さらに0.5%SDS中に0.4ml)が、200mM, NaCl 5mM Tris-HCl, およびpH8.0で溶出され、0.5mlの画分が、<sup>14</sup>Cおよびまたは<sup>3</sup>Hの放射線活性を評価された。真正のH A多糖類が、37℃3時間、Streptomyces hyalurolyticus(EC 4

.2.2.1)のHA特異的ヒアルロネートリアーゼで、別個に同一の試料の処理により評価された。そして消化は、ゲル濾過に施された。

#### 【 0 1 7 3 】

##### C. 8 SDS-PAGEおよびウエスタンブロット

SDS-PAGEは、Laemmli法により行われた。ニトロセルロースへのエレクトロトランスファーは、Bio-Radミニトランスブロットデバイスを用いて、20%メタノールと共に標準ブロッティングバッファー内で行われた。ブロットはTBS内で2%BSAと共にブロックされた。プロテインA/Gアルカリフォスファターゼ接合物(Pierce)およびp-ニトロブルーテトラゾリウム/5-ブromo-4-クロロ-3インドリル フォスフェート p-トリルイジン塩が、検出のために用いられた。

#### 【 0 1 7 4 】

##### C. 9 DNA配列および分析

プラスミドは蛍光標識されたベクタープラスミドを用いて両ストランド共配列決定された。配列決定反応は、蛍光標識プライマー(7-deazaGと共に)のために、Thermosequenase<sup>TM</sup>キットが用いられて行われた。試料は、ファーマシアALFエクスプレスDNAシーケンサー上で電気泳動され、データは、ALFマネージャーソフトv3.02により分析された。挿入物の内部領域は、ABIプリズム377(ソフトウェアバージョン2.1.1)を用いてインターナルプライマーと共に配列決定された。遊走性の領域は、Sequenase<sup>TM</sup>の7-deaza-DNAポリメラーゼ、7-deaza GTTPマスターミックス(USB)、および[ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP(Amersham Life Sciences)を用いて手動で配列決定した。得られた配列は、DNASIS, v2.1(ヒタチ ソフトウェア エンジニアリングCo., Ltd.)により分析されコンパイルされた。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列はジェンバンクおよび他のデータベースにおける他の配列と比較された。

#### 【 0 1 7 5 】

##### C. 10 seHASの同定

seHASの同定は、spHAS、DG42(開発の規制されたX. leavis HASであることが現在知られており、xlHASとして示される。)およびNodC(Rhizobium  $\beta$ -GlcNAcトランスフェラーゼ)の中の高い同一性のあるいくつかの部分为基础としたオリ

ゴヌクレオチドプライマーで、PCRアプローチを利用することにより行われた。X1HASおよびNodCタンパクは、spHASに対し、それぞれ～50%および～10%同一である。このストラテジは、spHASと66.4%同一の配列を有する459bpPCR産物を得、これはグループA (spHAS) HAシンターゼ遺伝子のグループCホモログス(scHAS)が同定されたことを示す。そして、遺伝子の完全なコード領域は、同様のPCRを基礎としたストラテジを用いて再構築された。そしてPCRプライマーの最終セットは、ゲノムDNAから完全なORFを増幅するために用いられた。この1.2kbのPCRフラグメントが発現ベクター-pKK223内に含まれており、そしてE. coli SURF細胞内に導入された際に、HA合成活性が、試験された5つのコロニーの5つから、単離された膜内において実証された。

#### 【 0 1 7 6 】

再構築された遺伝子のORFは、新規な予想された417アミノ酸のタンパクをコードしており、これはデータベースになく、そしてspHASより二個のアミノ酸分短いものであった。二つの細菌性のタンパクは、72%同一であり、そして核酸配列においては70%同一であった。scHASタンパクの予想された分子量は、47.778であり、予想された等電点は、pH9.1である。3つの近年同定された哺乳類のHAS類(muHAS1, muHAS2, muHAS3, 図2)は、バクテリアタンパクと同一である。二つのグループ間の全体としての相同性は、～28-31%であり、さらにscHASにおける多くのアミノ酸が、真核性のHAS類のそれと高い保存性を有する(例えば、K/RもしくはD/E置換)。A98R、PRCY-1HASは哺乳類HAS類に対して28-33パーセントの相同性を有し、そして脂質膜における同様のトポロジーを有する。哺乳類種内において、同じファミリーのメンバーは、ほとんど完全に相同である(例えば、muHAS1とhuHAS1は95%の相同性があり、muHAS2とhuHAS2とは98%の相同性を有する。)。しかしながら、そして図3に示すように、同じ種内であっても、異なるHASファミリーメンバーでは、より異なる(例えば、muHAS1とmuHAS2とは、53%の相同性であり、muHAS1とmuHAS3とでは57%の相同性であり、muHAS2とmuHAS3とは71%の相同性である。)。

#### 【 0 1 7 7 】

図10は、scHASのためのハイドロパシープロットと予想される膜トポロジー

を示すものである。StreptococcalグループCのHASのための親水性プロットは、KyteおよびDoolittleの方法(J. Mol. Biol. 157, 105, 1982)により、DNAsisを用いて生じたものであった。タンパクは、不可欠な膜タンパクであることが予想された。

#### 【 0 1 7 8 】

図11は、膜内のseHASのトポロジー的組織のためのモデルを示すものである。タンパクのために提案されたトポロジーは、チャージインルール(charge-in rule)にしたがい、大きな中央のドメインを内側に入れている。このドメインは、結合しそして酵素としての触媒作用を示す基質のほとんどを含んでいると思われる。全てのHASファミリーのメンバーにおいて保存されている、seHAS中のCys<sup>218</sup>は、他の3つのシステインと同様に、中央のドメイン中に見られる。Cys<sup>218</sup>は、重要な残基であり、その置換は、酵素により合成されるHA産物のサイズの分布を劇的に変更させる。

#### 【 0 1 7 9 】

seHASのために予想される全体の膜のトポロジーは、spHASおよび今まで報告されている真核性のHAS類のものと同様である。タンパクは、アミノ末端において二つの推定上の膜間ドメインを有し、カルボキシ末端において2-3の膜結合もしくは膜間ドメインを有する。二つのStreptococcal酵素のためのハイドロパシープロットが、事実上同一であり、そしてseHASにおけるK<sup>213</sup>-R<sup>216</sup> (spHASにおけるK<sup>213</sup>-K<sup>216</sup>)での~90残基の極めて疎水性の領域におけるトポロジーの予想の困難性が描かれている。

#### 【 0 1 8 0 】

seHASは、E. coli 細胞内で効果的に発現した。SDS-PAGEゲルの染色(図5)による評価として、全膜タンパクの概略10%がseHASである。42kDでの顕著なseHASバンドが、ベクターのみのコントロールレーンにおいて、量的に失われている。膜タンパクのためのこの通常でない高いレベルでの発現もまた、SURE細胞内の同様のベクターを用いた、spHASにおいても見出されている。約8%の膜タンパクが、E. coli SURE細胞内のspHASである。一方、グループCの膜内のseHASの量は、全膜タンパクの1%未満である。グループA膜のspHASは、かろうじて検出

される。E. coli SURE細胞内において発現される組換えseHASは、インビボでHAを合成しない。これは、これらの細胞が、要求される基質の一つであるUDP-GlcAを欠乏している細胞だからである。しかしながら、組換えseHASタンパクを含有する膜は、基質UDP-GlcNAcおよびUDP-GlcAを提供された場合は、HAを合成する(図12)。

#### 【0181】

図12は、組換えseHASによる真正なHAの合成を示すものである。組換えseHASを含む細胞もしくはベクターのみを含む細胞から調製されたE. coli膜(69 $\mu$ g)は、37℃1時間、700 $\mu$ MのUDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc(2.78 $\times 10^3$  dpm/nmol、白四角、黒四角)、および300 $\mu$ MのUDP[<sup>14</sup>C]GlcA(3.83 $\times 10^3$  dpm/nmol、白丸、黒丸)をここで記載したように200 $\mu$ lの最終容積において、培養する。酵素反応は、最終濃度2.5mMのEDTAの添加により停止される。反応混合物の半分は、37℃3時間、Streptomycesのヒアルロニダーゼと処理された。SDS(2%, w/v)は、ヒアルロニダーゼ処理(白丸、白四角)および未処理試料(黒丸、黒四角)に添加され、90℃1時間加熱された。試料は、カラムバッファー(5mM Tris, 0.2M NaCl, pH8.0)で500 $\mu$ lへ希釈され、遠心分離により透明化され、そして200 $\mu$ lはSephacryl S-500 HRカラム上にインジェクトされた。分画(1ml)は収集され、そして放射性活性が測定された。BDが、ブルーデキストランのピーク溶出位置である( $\sim 2 \times 10^6$  DA, Pharmacia)。Voは排除する体積を記し、Viは含まれる体積を記す。カラム内のHA分画の全量中に含まれる[<sup>14</sup>C]GlcA:[<sup>3</sup>H]GlcNAcの比率は、1.4であり、これは二つの基質の特定の活性の比率と同一である。したがって、産物内に含まれる糖類のモル比は、真正なHAで予想されるものと同様の1:1である。ベクター単独でトランスフォームされた細胞からの膜は、HAを合成しなかった。

#### 【0182】

120 $\mu$ MのUDP-GlcAおよび300 $\mu$ MのUDP-GlcNAcを用いた場合、HA合成は膜タンパク( $\leq 0.2\mu$ gにおいて)と直線関係であり、それは少なくとも1時間の間である。また、形質転換されていない細胞から、もしくはベクターのみの形質転換である細胞から調製された膜は、検出可能なHA活性を有さない。Mg<sup>2+</sup>が

EDTAとキレート化（コントロールの＜5％）する場合、もしくは二つの基質のいずれかが除外された（コントロールの～2％）場合、HA合成は無視される。組換えseHASもまた、糖ヌクレオチド基質への期待される特異性を示し、二つの通常の基質（表II）のいずれかと共に、UDP-GalA、UDP-Glc、もしくはUDP-GalNAcのいずれかと共重合できない。

#### 【 0 1 8 3 】

ゲル濾過分析を基礎として、単離された膜におけるseHASにより合成されるHAの平均量は $5-10 \times 10^6$  Daである。組換えseHASの産物は、等モル含まれる両糖類を基礎とした真正HAであること、および特定のStreptomycesのヒアルロニダーゼにより分解される感度で判断される（図12）。全てのHA合成のための条件が最適でないにもかかわらず（なぜなら、一つの基質の～90％が産物内に含まれていた。）、酵素はHA鎖の長さの幅広い分布を生じさせた。ピークの分画は、約36,000の単独の糖類を含むポリマーである $7.5 \times 10^6$  DaのHA量に相当する。HAサイズの分布は、 $2-20 \times 10^6$  Daの領域のこのカラムにより分析された。

#### 【 0 1 8 4 】

seHASの推定されるタンパクの配列は、グループCタンパクと交差反応するためのspHASタンパクの抗体の能力により確認される（図8）。全てのspHASタンパクに対する、もしくはspHASの中央ドメインだけに対するポリクローナル抗体もまた、seHASタンパクと反応する。seHASのC末に対するアンチペプチド抗体は、seHASタンパクにおけるこのいくらか異なる部位と交差反応しない。しかしながら、spHASの配列のE<sup>147</sup>-T<sup>161</sup>に対するアンチペプチド抗体は、seHASにおける同じであると予想される配列を認識した。アンチペプチド抗体もまた、Streptococcal膜において野生型のseHASおよびspHASタンパクと反応し、両種からの野生型および組換え酵素が同一のサイズであることを確認する。spHASタンパクのように、seHASはSDS-PAGE上を異常な速度で移動する。計算された量が47,778Daであるにもかかわらず、SDS-PAGEによるM<sub>r</sub>は一貫して～42kDaである。

#### 【 0 1 8 5 】

二つの細菌性酵素における、配列の中央部分ドメインの配列の同一性および予想される構造の全体的な同一性のため、E<sup>147</sup>-T<sup>161</sup>領域に対するタンパク特異

的抗体は、二つの異なる酵素の遺伝子で形質転換した細胞から調製された膜において発現するHASタンパクのために、標準化して用いることができる。このアプローチを用いると、組換えspHASもしくはseHASの本質的に同一である試と共に、膜は、II A合成の初期の速さおよびHA産物のサイズの分布に関して比較された。

【 0 1 8 6 】

spHASで示されるように、seHASによるHA鎖の合成はプロセスである。酵素は、最終的な産物が放出されるまで、HA鎖と連結して止まることが明らかである。したがって、II A鎖合成の最初のラウンドの間、初期において製造されるHA鎖のサイズの分布を検査することにより、seHASおよびspHASによるHA伸長の速度を比較することは可能である。種々の場合におけるHA産物のサイズのゲル濾過分析を基礎として、我々は、seHASによる平均伸長速度が、37℃において約9,000単糖/分であることを確認している(図9)。5分間で、酵素は $5-10 \times 10^6$  DaのHA鎖を重合することができる。したがって、60分間の培養により、各酵素分子は、そのような大きさのHA分子を5-8のレベルで、潜在的に、開始し、完了し、そして放出することができる。初期においては(例えば、 $\leq 1$ 分)、最初のHA鎖の長さを反映して、seHASにより産生されたHAのサイズの分布はspHASと比較して、長い種類の側に移行した。60分までに、II A産物の大きさの二つの分布は、区別がつかなくなる。

【 0 1 8 7 】

クローニングされたseHASは、真正グループCのHAシンターゼを代表する。したがって、以前に報告され、開示された「グループC」タンパクは、真のグループCのHASではない。seHASタンパクは、いまこの急激に成長するHAシンターゼファミリーに含まれるウィルス、細菌、および脊椎動物からの近年知られたII Aシンターゼの9つに対し相同である。この相同性は、図2に特に示されている。哺乳類において、HAS1、HAS2、およびHAS3で示される3つの遺伝子は単離され、ヒトおよびマウスの両者において三つの異なる染色体にマッピングされた。両生類においては、いままで単離された単一のHASタンパクが、開発上規制されるDC42であり、これは1988年にクローニングされ、そして近年酵母の膜において組換えタンパクの分析によりHAシンターゼ活性をコードすること

が示された。おそらく、他の*X. leavis* HAS遺伝子もすぐに単離されるであろう。

【 0 1 8 8 】

他の進化のモデルは、次の点を示唆する。すなわち、プリミティブな細菌性HAS前駆体は、脊椎動物の研究開発中の早期にその地位を奪われたかもしれず、もしくは、プリミティブな細菌を原始HAS中に捕らえた場合、HAカプセルの作製という細菌病原性のストラテジが開発された。共通の構造的解答への細菌および真核生物HASの集中的な発展は、ありうそうにないように思われるが、生じる可能性はある。

【 0 1 8 9 】

HASのための3つの哺乳類のアイソザイムのいずれも、それらのIIA産物サイズに関して、いまだ酵素的に特定されていない。少なくとも、10個の識別されたHASタンパクが、同様なトポロジーで膜タンパクであることを予想される。HAの合成は原形質膜で生じ、HAは媒体内に放出されるか、もしくは細菌カプセルを形成するためもしくは真核性のペリセルラーコートを形成するために連結されて細胞に残留する。細胞質内の糖ヌクレオチド基質は、HA鎖を構築するのに用いられ、HA鎖は外界へ膜を介して突出する。

【 0 1 9 0 】

HASタンパクの非常に疎水性の高いカルボキシルタンパクにおけるタンパクのトポロジーは、酵素がいかに成長するHA鎖を伸ばすと同時に膜を介して突出させるかを理解する上で重要であることを明らかにする。例えば、先例の無い酵素の活性が、脂質二重層とタンパクとの通常でない、かつ複雑な相互作用を要求する可能性がある。spHAS-アルカリフォスファターゼ融合タンパクの分析に基づく事前の結果は、アミノおよびカルボキシル末端、および大きな中央のドメインは図10および11に示すように、全てが細胞内であることを示す。scHASタンパクもまた、大きな中央部ドメイン（全タンパクの～63%）を有し、これは二つの基質結合部位、およびHA合成のために必要とされる二つのグリコシルトランスフェラーゼ活性部を含むことを明らかにする。近年のソフトウェアプログラムが、長いC末端の疎水性の伸長部内の膜結合ドメインの数および性質を信頼



性高く予想することができないにもかかわらず、提案されたトポロジカルな配置は、現在の証拠と合致し、そして二つの追加の予測される膜間ドメインと共にタンパクのC末端の伸長のために～40%より長い、真核性の酵素にも同様に適用される。

#### 【 0 1 9 1 】

spHAS中の6つのCys残基のうちの4つは、seHAS類と共に保存される。両細菌性の酵素内のCys<sup>123</sup>のみが、HASファミリーの全てのメンバーにおいて保存される。例えばp-マーキュロベンゾエイトもしくはNEMといった、スルフヒドリル反応剤は、HAS活性を大きく阻害するので、この保存されたCysが酵素の活性に必要もしくは重要である可能性が高い。しかしながら、部位特異的突然変異の研究からの初期の結果は、spHASのC225S変異体は不活性でなく、野生型の活性の5-10%を維持していることを示す。

#### 【 0 1 9 2 】

特異的なオリゴヌクレオチドを用いたseHAS単独、spHAS単独、もしくはspHASおよびspHASの両者をコードする核酸配列の認識は、図13に示されている。3つのセンス-アンチセンスオリゴヌクレオチドの対は、配列番号1の配列およびspHASをコードする配列に基づいて設計された。seHASに基づく核酸セグメント (se1-se2およびsesp1-sesp2) は、図14に示されている。これら3つのオリゴヌクレオチドの対は、グループC (seHAS) (レーン2、4、および6) もしくはグループA (spHAS) (レーン3、5、および7) のいずれかのstreptococciからのゲノムDNAとの代表的なPCR反応の下でハイブリダイズされた。レーン1および8は、kb(キロベース)での分子量標準の位置を示す。PCR反応は、次に示す25サイクルで、TaqDNAポリメラーゼ(Promegaより)を用いて行われた。DNAの変性を行うために、摂氏94度で1分間、ハイブリダイゼーションを可能するために摂氏48度(より小さい共通のsespプライマーのためには摂氏42度)で1分間、そしてDNA合成のために摂氏72度で1.5分間。PCR反応混合物は、次いで1%アガロースゲル上で電気泳動により単離された。

#### 【 0 1 9 3 】

se1-se2プライマー対は、グループCのHAS(seHAS)のためにユニークで特異的

に設計された。sp1-sp2プライマー対は、グループAのHAS(spHAS)のためにユニークで特異的に設計された。sesp1-sesp2プライマー対は、グループAおよびグループCのHASの核酸配列の両者にハイブリダイズするように設計された。3つのプライマー対の全てが期待通りに作用し、交差的にハイブリダイズし、そして特異的および／またはユニークであるPCR産物の発生をサポートする好ましい能力を示した。

#### 【 0 1 9 4 】

特異的PCRもしくはハイブリダイゼーションのために用いられるオリゴヌクレオチドは、図14に示される。配列番号3、4、5および6の合成オリゴヌクレオチドは、配列番号1の相当する領域内に示された。これらの領域は太字で示され、それぞれプライマーse1、se2、sesp1、およびsesp2としてマークがなされている。＃1は、センス方向におけるプライマーを示し、＃2はアンチセンス方向のプライマーを示す。4つのオリゴヌクレオチドの各々は、seHAS配列と特異的にハイブリダイズし、そして好ましいセンス／アンチセンスプライマーの対は図13に示すように、ポリメラーゼ連鎖反応に用いるのに好適である。

#### 【 0 1 9 5 】

図7は、酵母の膜において発現する組換えHASにより合成されたヒアルロン酸のゲル濾過分析を示すものである。spHAS（元のValコドンがMetにスイッチされている）に相当する419アミノ酸残基のオープンリーディングフレームをコードするDNAフラグメントは、pYES/HAを製造するためのpYES2酵母発現ベクター（Invitrogenより）内に標準的な方法によりサブクローニングされた。この構築物を有する細胞からの膜が、ガラスビーズで攪拌することにより調製された。実質的なHA合成活性および「42 kDa」HASタンパクを含むpYES/HA構築物から誘導された試料が、特異的な抗体を用いてウェスタン分析により検出された。ベクターのみを有する細胞からの膜は、活性も免疫反応によるバンド（図示略）のいずれも有するものではなかった。膜（315  $\mu$ gタンパク）は、最初、担体の無いUDP-[ $^{14}$ C]GlcA（1  $\mu$ Ci/ $^{14}$ C）および900  $\mu$ Mの標識されていないUDP-GlcNAcと共に、50mMのTris、pH7、20mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのDTT、および0.05MのNaCl（450  $\mu$ l反応容積）内で、摂氏30度、1.5分間培養した。その後、次いでパルスーラベル

ピリオド ノンラジオリラベルドUDP-GlcAが添加され、最終濃度が900  $\mu$ Mとした。試料(100  $\mu$ L)が、「チェイス」後、1.5分(黒丸)、および15(黒四角)、および45(黒三角)分でのパルスの後、採取された。反応は、2%までのSDSの添加により終結され、1分間、摂氏95度で加熱された。試料の半分が、0.2MのNaCl、5mMのTris、pH8で平衡とされたSephacryl s-500HRゲル濾過カラム(Pharmacia; 1  $\times$  50 cm)上にインジェクションされる前に、試料は遠心分離(10,000  $\times$  g、5分)により清澄化された。

【0196】

カラムは、0.5ml/分で溶出され、分画内の放射線活性は、BioSafeIIカクテル(4.5ml, Research Products Intl.)を添加した後、液体シンチレーション計数により定量された。溶媒容積および全体的に含まれる容積は、それぞれ14mlおよび35.5mlの溶出体積であった。ブルーデキストラン(平均  $2 \times 10^6$  Da)のピークは、25-27mlの溶出であった。真核生物の酵母細胞において発現した組換えHASは、インビトロで高分子量のヒアルロン酸を産生した。

【0197】

したがって、本発明は、酵素的な活性を有するHASをコードするコード領域を有する単離された核酸セグメント、seHAS遺伝子からヒアルロン酸を産生する方法、そしてseHAS遺伝子によりコードされたHASから産生するヒアルロン酸の使用を提供し、それらは十分に上述した目的および利点を充足するものであることは明らかである。本発明は、その特定の実施態様に関連して記載されたが、多くの置換、修正、および変更が当業者にとって自明であることは明白である。したがって、添付の請求の範囲の精神および幅広い範囲内のすべてのそのような置換、修正および変更は、本発明に包含されるものである。

【配列表】

ATGAGAACATTAAAAAGCTCATAACTGTTGTGGCCCTTAGTATTTTTTGGGTACTGTTGATTTAAGCTCAAT	72
GTTTATCTCTTTTGGTGTCTAAAGGAAGCTTTGTCAATTTATGGCTTTTTGCTGATAGCTTACCTATTAGTCAAA	144
ATGTCCTTATCCCTTTTTTACAAAGCATTAAAGGAAAGGGCTGGGCAATATAAGGTTGCAGCCATTATTCOC	216
TCTTAATAACGAAGATGCTGAGTCATTGCTAGAGACCTTAAAAAGTGTTCAGCAGCAAACTTATCCCTAGCA	288
GAAATTTATGTTGTTGACGATGGAAGTGTGATGAGACAGGTATTAAAGCATTTGAAGACTATGTGCGTGAC	360
ACTGGTGACCTATCAAGCAATGTCTATTGTTTCATCGGTGAGAGAAATCAAGGAAAGCGTCATGCCAGGGCC	432
TGGGCCCTTTGAAAGATCAGACGGCTGATGTGTTTTTTGACGGTTGACTCAGATACTTATATCTACCCGTGATGCT	504
TTAGAGGAGTTGTTAAAAACCTTTAATGACCCAACTGTTTTTGGCTGCGACGGGTCACCTTAATGTCAGAAAT	576
AGACAAACCAATCTCTTAAACAGCTTTGACAGATATTCGCTATGATAAATGCTTTTGGCGTTGAACGAGCTGCC	648
CAATCCCTTACAGGTAATATCTCTTTTGGCTCAGGTCCGCTTAGCGTTTACAGACGGCAGGTTGTTGTTCT	720
AACATAGATAGATACATCAACAGACCTTCCTGGGATTCCTGTAAATATTGGTGATGACAGGTGCTTGACC	792
AATATGCAACTGATTTAGSAAAGACTGTTTATCAATCCACTGCTAAATGTATTACAGATGTTCTGTGCAAG	864
ATGCTACTTACTTGAAACGACGAAACCGCTGGAAACAATCTCTTCTTLAGAGAGTCCATTATTCTGTTAAG	936
AAATCTGAAACAATCTCTTTGTAGCCCTATGGACCATACTTGAGGTGCTATGTTTATGAGGCTTGTGTTAT	1008
TCTGTGGTGGATTTCTTTGTAGGCAATGTCAGAGAAATTGATTGGCTCAGGGTTTTAGCCTTTCTGCTGATT	1080
ATCTTCATTGTTGCCCTGTTTTCGGAACATTCATTACATGCTTAAAGCAACCGCTGTGCTCTCTTGTATCTCCG	1152
TTTATCCGGTGTCTGCATTGTTTGTCTACAGCCCTTGAATATATATCTCTTTTACTATTAGAAATGCT	1224
GACTGGGGAAACGTAATAAAATTATTATAA	1254

SEQUENCE ID NO. 1

[illegible]

SEQUENCE ID NO. 2

## SEQUENCE ID NO. 3

5'-GCTGATGAGACAGGTATTAAGC

primer: se1 (sense, nucleotides G<sup>316</sup> - C<sup>337</sup>)

## SEQUENCE ID NO. 4

5'-ATCAAATTCTCTGACATTGC

primer: se2 (antisense, for sense nucleotides G<sup>1031</sup> - T<sup>1050</sup>)

## SEQUENCE ID NO. 5

5'-GACTCAGATACTTATATCTA

primer: sesp1 (sense, for nucleotides G<sup>475</sup> - A<sup>494</sup>)

## SEQUENCE ID NO. 6

5'-TTTTTACGTGTTCCCCA

primer: sesp2 (antisense, for sense nucleotides T<sup>1228</sup> - A<sup>1244</sup>)

## Protein sequence of A98R, the FBCV-1 HA synthase

```

1   HGKNIIMVS WYTIITSNLI AVGGASLLLA PAITGYVLHM NIALSTINGV SAYGIFVEGF
61  FLAQVLFSEL NRKRLRKWIS LRPKGHNOVR LAVIAGYRE DPYMFQKCLE SVESDYGNV
121 ARLICVTDGD EDDDMRMAAV YKAIYNDNIK KPEFVLCESD DEKGERIDSD FSRDICVLQP
181 HRGERECLYT GEOLAKMDPS VNAVVLDSQ TVLEKDAILE VVYPLACDPE IQAVAGECKI
241 WNTDTLLSLL VANRYYSAFQ VERSAQSFPR TVQCVGGLG AYKDIIMEIK DPMISQRELG
301 QKCTYGDERR LTNEILMRGK KVPTEFAVG WSDSTTNVFR YTVQQTREK SNCREIWTLL
361 FAANKQLSG INLAPECLYQ ITYFFLVYL ESRLAVEAUF RAQCATVIYS TTVALIKGY
421 FEFRAKDTRA EYFVLYTFVY FFCMIPARIT AAGTLNDIGW DTRGGNEKPS VGTVALMAR
481 QYLIATWRA AVVGAGVYSI VNNMHEDMNS LSYRFALYGI CSXIVFIVIV LVVYFTGKIT
541 TWTPTKLOKE LIEDRVLYDA TTNAQSV

```

557

SEQUENCE ID NO. 7

## Nucleotide Sequence of A98R gene in the FBCV-1 Virus Genomes

Start: ATG 50901 Stop: TGA 52607

```

50881 aagactttctt gaaagttaca ATGggcassa atataatcat aatgggttctg tggtaaccca
50941 tcatatcttc aaatctaac ggggttggg gagctctctt aatcttggct cgggaatta
51001 ctgggtatgt tctacattgg aatattgtc totogaaat ctggggagta taaggttatg
51061 gtatttttgt ttttgggttt ttcttggac aagttttatt ttcaagaactg aacaggaac
51121 gtcttggcaa gtgattttct ctcaaccta aggttggaa tgaatgtctg ttggtctga
51181 tcatctgttg atatogogag gttccttata tggtaacgaa ttgctctgag tctgtactg
51241 actctgatta tggcaacgtt gccctctga tctgtctgat tgaagggtgat gaggagatg
51301 atattgggat ggctgcgttt taacaaggga tctacaatga taatatcaag aagctcaggt
51361 ttgtctgtg tgaagcagac gacaaggaa gtgaacgaat cgaatctgat ttctctgcg
51421 acatttctgt cctcagcgt catcgtgaa aaggggagtg totttatac gggttcaac
51481 ttgcaaatgt ggaacacagt gtcactgtg tcttctgat tgaacagcat accgttctg
51541 aagaggatgc tattctggaa gttgtatcac cacttgcagt cgaatcagag atcaagcgc
51601 ttgcaggtga gtgtaagatt tggaaacaa acactctttt gactctctc gtgcttggc
51661 ggtactatct tgcgttttgt gtggaagga gtgcccagtc ttttttcagg actgttcat
51721 gcgttggggg gccactgggt gctacacaga ttgatatcat taaggagatt aaggacccct
51781 ggaattccaa gcgctttctt ggtcagaagt gtacttaayy tgaagacccg cggctaccca
51841 aagaatctt gatggttgtt aaaaagggtt ttttcaatcc atttgcgtgt ggttgcctg
51901 acagtcogac caatgtgttt oggtacatcg ttcaagcagc cggctggagt aagtogtgt
51961 gccgcgaat ttgttacac ctcttgcgc cgtggaaaca cgttttgtct ggaatttggc
52021 tggcctttga atgtttgtat caaattacat acttcttctt cgtgatttac ctctttctc
52081 gctagcoggt tgaagcagac cctcgcgcac agacagccac ggtgatttgc agcaccacg
52141 ttgcattgat taagtgtggg tatttttoat tccagaccaa ggaatttcgg gcgttttact
52201 ttgtgcttta taactttgtt tactttttct gatatgattc ggccaggatt actgcattg
52261 tgaagctttg ggaacttgsc tgggatactc ggggtggaaa cgaagagcct taogttggca
52321 ccgggttgcg tctgtggga aagcaatata tcaattgata tatgtgtgtg gctgggttg
52381 ttggogctgg agtttacagc atcgtccata actggatgtt cgaattggaat tctctttctt
52441 atcgttttgc tttggttgtt atttgttctt acattgtttt tattgttatt tgcctggttg
52501 tttatttcc cggcaaatat acgacttggg atttcaogaa gcttcagaag gactaatcg
52561 aggatoggt tctgtaogat gcaactacca atgctcagtc tctgtgattt tctctgcaag

```

SEQUENCE ID NO. 8

Nucleotide and Protein Sequence of *Pasteurella multocida*

+10

```

1      M N T L S Q A I K A Y N S N D Y Q
-18  ATTTTAAAGGACAGAAAATGAATACATTATCAGAGCAATAAAAGCCTATAACAGCAATGAGTATCAA
18   L A L K L F E K S A E Y Y G R K I V E F Q I T
52   TTAGCACTCAAATTATTTGAAAAGTCGGCGGAAATCTATGGACGGAAAATGTGTTGAATTTCAATTACC
41   K C Q E K L S A H P S V N S A H L S V W K E E
121  AAATGCCAAGAAAACCTCTCAGCACATCCTTCTGTTAATTCAGCACATCTTCTGTAAATAAAGAGAA
64   K V N V C D S P L D I A T Q L L L E N V K K L
190  AAATCAATGTTTGGGATAGTCGGTTAGATATTCGACACCACTGTACTTCCAACTAAAAAATAA
87   V L S D S E K N T L K N K W K L L T E K K S E
259  GTACTTCTGACTCGGAAAAAACACGTTAAAAATAAATCGAAATTCCTCACTGAGAGAAATCTGAA
110  N A E V R A V A L V F K D F F K D L V L A P L
320  AATCGGAGGTAGAGAGGGTGGCCCTTGAOCAAAGATTTTCCCAAGATCTGGTTTAGCGGCTTTA
133  P D R V N D F T N Y K K R K K R L G I K P E H
397  CCTGATCATGTAAATGATTTTACATGCTACAAAAGCGAAGAAAAGACTTGGCATAAAGCTGAAAT
156  Q H V G L S I I V T T F N R P A I L S I T L A
466  CAACATGTTGGTCTTTCTATTATCGTTACAAACATTCAATCGACCGCAATTTTATGGATTACATTAGOC
179  C L V N O K T N Y P F E V I V T D D G S Q E D
535  TGTTTAGTAAACCAAAAACACATTACCCGTTTCAAGTTATCGTGACAGATGATGGTAGTCAGGAGAT
202  L S P I I R Q Y E N K L D I R Y V R Q K D N G
604  CTATCGCGGATCATTCGCCAATATGAARATAAATTGGATATTCGCTACGTCAGACAAAAGATAACGGT
225  F Q A S A A R N M G L R L A K Y D F I G L L D
673  TTTCAAGCCAGTGGCGCTCGGAATATGGGATTACGCTTAGCAAAATATGACCTTATTGGCTTACTCGAC
248  C D M A P N P L W V H S Y V A E L L E D D D L
742  TGTGATATGGCGCAATCCATTATGGGTTCAATCTTATGTTGCAGAGCTATTAGAAGATGATGATTTA
271  T I I G P R K Y I D T Q H I D P K D F L N N A
911  ACAATCATTTGGTCCAAGAAAATACATCGATACACAACATATTGACCCAAAAGACTTCTTAATAAACGG
294  S L L E S L P E V K T N N S V A A K G E G T V
880  AGTTTGCTTGAATCATTACAGAAAGTGAACCAATATAGTGTGCGCAAAAGGGGAAGGAACAGTT
317  S L D W R L E Q F E K T E N L R L S D S P F R
949  TCTCTGGATTGGCGCTTAGAACATTCGAAAAACAGAAAATCTCCGCTTATCCGATTCCGCTTCCGT
340  F F A A G N V A F A K K W L N K S G E F D E E
1018 TTTTTCGGCGGGTAATGTTGCTTTCCGCTAAAAATGGCTAAATAAATCCGGTTTCTTTGATGAGGAA

```

SEQUENCE ID NO.19

(Page 1 of 3)



```

363 F N H W G G E D V F P G Y R L F R Y G S F F K
1087 TTTAATCACTGGGTGGAGAAGATGTGGAATTTGGATATCGCTTATTCGGTTAOGGTAGTTTCTTAA
386 T I D G I M A Y H Q E P P G K E N E T D R E A
1156 ACTATTGATGGCATTATGGCCTACCATCAAGAGCCACCAGGTAAAGAAATGAAACCGATCGTGAAGCG
409 G K N I T L D I M R E K V P Y I Y R K L L P I
1225 GGNAAAAATATTACGCTCGATATTATGAGAGAAAGGTCCCTTATATCTATAGAAAACCTTTACCAATA
432 E D S H I N R V P L V S I Y I P A Y N C A N Y
1294 GAAGATTCCCATATCAATAGAGTACCTTTAGTTTCATTTATATCCAGCTTATAACTGTGCAAACCTAT
455 I Q R C V D S A L N Q T V V D L E V C I C N D
1363 ATTCAAGCTTGGTAGATAGTGCACCTGAATCGACTGTTGTTGATCTCGAGGTTTGTATTGTACGAT
478 G S T D N T L E V I N K L Y G N N P R V R I M
1432 GGTTCAACAGATAATACCTTAGAAGTGATCAATAGCTTTATGGTAATAATCTAGGGTAOGCATCATG
501 S K P N G G I A S A S N A A V S F A K G Y Y I
1501 TCTAAACCAATGGCGGAATAGCCTCAGCATCAATGCAGCCGTTTCTTTTGTAAAGGTATTACATT
524 G Q L D S D D Y L E P D A V E L C L K E F L K
1570 GGGCAGTTAGATTGAGATGATTATCTTGAGCCTGATGCAGTTGAACCTGTGTTTAAAGAAATTTTAAAG
547 D K T L A C V Y T T N R N V N P D G S L I A N
1639 GATAAACGCTAGCTTGTGTTTATACCCTAATAGAAACGTCAATCCGGATGGTAGCTTAATCGCTAAT
570 G Y N W P E F S R E K L T T A M I A H H F R M
1708 GGTACAAATTGGCCAGAATTTTCACGAGAAAACCTCACACCGCTATGATTGCTCACCCTTTAGAATG
593 F T I R A W H L T D G F N E K I E N A V D Y D
1777 TTCACGATTAGACCTTGGCATTATACCTGATGATTCATGAATAAATGAAAATGCCCTAGACTATGAC
616 M F L K L S E V G K P K H L N K I C Y N R V L
1846 ATGTTCTCCTCAAACTCAGTGAAGTTGGAATTTTAACATCTTAATAAATCTGCTATAACCGTGTATTA
639 H G D N T S I K K L G I O K K N H F V V V N O
1915 CATGGTGATAACACATCAATTAAAGAACTTGGCATTCAAAGAAAAACCTTTTGTGTAGTCAATCAG
662 S L N R Q G I T Y Y N Y D E F D D L D E S R K
1984 TCATTAAATAGACAAGGCAAACTTATTATAATTATGACGAATTTGATGATTAGATGAAAGTAGAAAG
685 Y I F N K T A E Y Q E E I D I L K D I K I I Q
2053 TATATTTTCAATAAAACCGCTGAATATCAAGAAGAGATTGATATCTTAAAGATATTAAATCATCCAG
708 N K O A K I A V S I F Y P N T L N G L V K K L
2122 AATAAGATGCCAAATCGCAGTCAGTATTTTATCCCAATACATTAAACCGCTTAGTGAAAAACTA
731 N N I I E Y N K N I F V I V L H V D K N H L T
2191 AACAAATATTATTGAATATAATAAAATATATTCTGTTATTGTTCTACATGTTGATAAGAATCATCTTACA
754 P D I K K E I L A F Y H K H Q V N I L L N N D
2260 CCAGATATCAAAAAAGAAATACTAGCCTTCTATCATAAACATCAAGTGAATATTTTACTAATAATGAT

```

SEQUENCE ID NO.19

(Page 2 of 3)

```

777   I S Y Y T S N R L I K T E A H L S N I N K L S
2329  ATCTCATATTACAGAGTAATAGATTAAATAAACTGAGGCGCATTTAAGTAAATATTAAATAAATTAAGT

800   Q L N L N C E Y I I F D N H D S L F V K N D S
2398  CAGTTAAATCTAAATTGTGAATACATCATTTTGTATAATCATGACAGCCTATTTCGTTAAAAATGACAGC

823   Y A Y M K K Y O V G M N F S A L T H D W I E K
2467  TATGCTTATATGAAAAAATATGATGTGCGCATGAATTCTCAGCATTAACACATGATTGGATOGAGAAA

846   I N A H P P F K K L I K T Y F N D N D L K S M
2536  ATCAATGCGCATCCACCATTAAAAAGCTCATTAAAACTTATTTTAAATGACAATGACTTAAAAAGTATG

869   N V K G A S Q G M F M T Y A L A H E L L T I I
2605  AATGTGAAAGGGGCATCACAAAGGTATGTTTATGACGTATGCGCTAGCGCATGAGCTTCTGACGATTATT

892   K E V I T S C Q S I D S V F E Y N T E D I W F
2674  AAAGAAGTCATCACATCTTGCCAGTCAATTGATAGTGTGCCAGAATATAACACTGAGCATATTTGGTTC

915   O F A L L I L E K K T G H V F N K T S T L T Y
2743  CAATTGCACTTTTAACTTTAGAAAAGAAAACCGGCCATGTATTTAATAAAACATOGACCCCTGACTTAT

938   M P W E R K L Q W T N E Q I E S A K R G E N I
2812  ATGCCTTGGGAACGAAATTAATGGAACAATGAACAAATTGAAAGTGCAAAAGAGGAGAAAATATA

961   P V N K F I I N S I T L *
2881  CCTGTTAACAGTTCATTATTAATAGTATAACTCTATAA

```

SEQUENCE ID NO.19  
(Page 3 of 3)

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、seHASとspHAS遺伝子との間で交差ハイブリダイゼーションが発生しなかったことを示す。

【図 2】

図 2 は、細菌および真核HASタンパク質に対するseHASの関連性を図示する。

【図 3】

図3は、既知のヒアルロナンシンターゼの幾つかの間の進化上の関係を図示する。

【図4】

図4は、種々の処理された連鎖球菌HAS酵素によって産生したHAのサイズ分布を示す。

【図5】

図5は、大腸菌中での組換えseHASとspHASとの過発現を図示する。

【図6】

図6は、連鎖球菌HASシンターゼの精製を示す。

【図7】

図7は、酵母膜中で発現した組換え連鎖球菌HASによって合成されたIIAのゲル濾過分析を示す。

【図8】

図8は、特定の抗体を使用した組換えseHASのウェスタンブロット分析である。

【図9】

図9は、組換えseHASおよびspHASによって産生されたHAのサイズ分布の運動分析である。

【図10】

図10は、seHASと、予期されたメンブラン関連領域の親水性プロットを示すグラフである。

【図11】

図11は、膜中のseHASのトポロジー組織を図示する模型である。

【図12】

図12は、組換えseHASによる正統的なIIAの合成を示す。

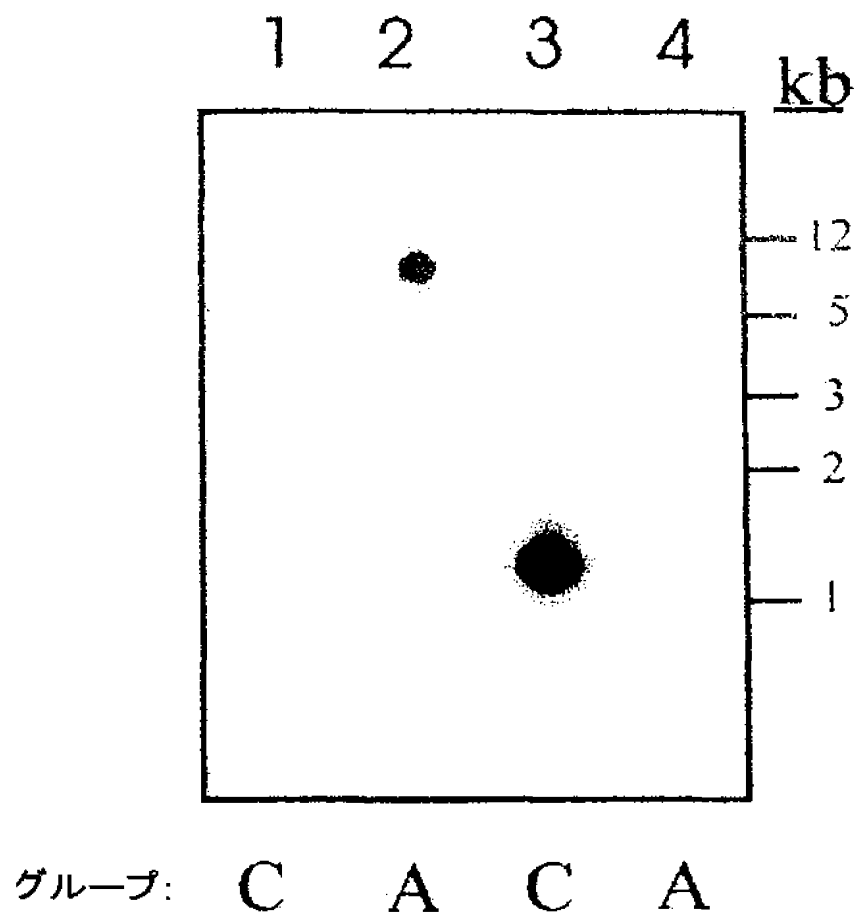
【図13】

図13は、seHASをコード化し、spHASをコード化し、あるいはseHASとspHASとの双方をコード化する核酸配列を、特異的なオリゴヌクレオチドおよびPCR法を使用して認識することを示す。

【図14】

図14は、特異的PCRハイブリダイゼーションに使用したオリゴヌクレオチドを示す。

【図1】



【 図 2 】

cvHAS	NG--KNITIM	VSMTTITS-	-----NL	KAVGGASLI	APAITCVLH	39
seHAS	MYLENLIY			VAFSIFWUL	I-----VNV	28
spHAS	VPIFKTLI-			LSFIFLISI	I-----LNM	25
huHAS	MHCERFLCYL	RI---IGTIL	-----	FGVSL	LGITANIVG	33
xlHAS	HK-EKAAETH	EIPEGIPKOL	EPEHPTLMRI	IYYSFGVVL	ATITANVAE	49
cvHAS	MNIALST--I	WGVSAIGIFV	GGTFLAQVLF	SELNKRRLRK	WISLRPKGN	87
seHAS	YLGAKG---	SLSYIGILL	IAYLLVHSL	SFF-YKPEKG	R---AGQ--Y	65
spHAS	YLGQT-5---	TVGIGVIL	ITTLVILGL	SFL-YEPKPG	N---EHD--Y	64
huHAS	TQIQTQNYV	FSTGLGAPL	ASHLLIQSLF	AFLEHREMKK	SLETPIK--L	81
xlHAS	FQVLKHEAIL	FSLGLGLAH	LLHLHQSGLF	AFLEIRRVNK	S-ELFGS--F	96
cvHAS	DVRLVIRAG	FREFVMSDK	CHLVKDSM	GNVA-RLIC	YDDEDDMR	136
seHAS	K--VAIRER	INDAESLLE	TKRVOOQT	PLAE--IYV	DGSADEGTI	111
spHAS	K--VAIRER	INDAESLLE	TKRVLQQT	PLSE--IYV	DGSSHTDAI	110
huHAS	MKTVILCHAA	ICMOPDYLRK	CHGVNRLT	PG--IKVVM	ICDSEDDLY	129
xlHAS	KKTVALTAG	ICMOPDYLRK	CHGVNRLT	PG--IKVVM	ICDSEDDLY	146
cvHAS	MAAVYKAIYN	DN-----	-----YKKE	-----FV	ICESDDERGE	168
seHAS	KR-----	---IEDYVRD	-----	TGDSSENVIV	HRSEKNOGKR	140
spHAS	QL-----	---ILEYVNA	-----	EVOICRNVIV	HRSEKNOGKR	139
huHAS	MNDIFSEVNG	ADKATYINX	NHFE-KGPG	ETDES-----	-----HKSE	168
xlHAS	MNDIFSEVNG	ADKATYINX	NHFE-KGPG	ETDES-----	-----HKSE	196
cvHAS	RISDE---S	RDICVLDPKR	GRRECLYTG	GLANNDPFW	AVULDESPV	212
seHAS	KA-----	---IAW---	-----AW	E-RSDADV-	FLTV-ESDY	183
spHAS	KA-----	---IAW---	-----AW	E-RSDADV-	FLTV-ESDY	182
huHAS	QVTVQLVLSN	KSCICIKMG	GKREVMYTA	R--ALGRSD	YVQVCHMDK	216
xlHAS	MNVELVRNK	RCVCINCMG	GKREVMYTA	Q--AIGTSVO	YVQVCHMDK	244
cvHAS	LEKDAILEV	YPLACDPEIC	AVAGECKIM	T-DTLISLV	AWRYYSKCV	261
seHAS	IYFDALIELL	KTFNDPTVFA	ATG-RLNVR	RQTNLLTAL	DIFVONKGV	212
spHAS	IYFDALIELL	KTFNDPTVFA	ATG-RLNVR	RQTNLLTAL	DIFVONKGV	211
huHAS	LDPASTVNV	KVLECDPHVG	GVGGDQIL	KVDSHISFLS	SVLWNRH	266
xlHAS	LDLATVNAV	KVLESDMYC	AVCGDVRL	FYDSFISFMS	SLVWNRH	294
cvHAS	ESACSTFRT	VQVGGSDGA	YKIDIIKEIK	DPWISRL	OKCTYKDR	311
seHAS	ESACSTFRT	ILVCGSDSV	YREUVVFT	DRYINGTL	TPVSLDRC	262
spHAS	ESACSTFRT	ILVCGSDSV	YREUVVFT	DRYINGTL	TPVSLDRC	261
huHAS	ESACSTFRT	VQVGGSDGA	YKIDIIKEIK	DPWISRL	OKCTYKDR	316
xlHAS	ESACSTFRT	VQVGGSDGA	YKIDIIKEIK	DPWISRL	OKCTYKDR	344
cvHAS	TEILNRK	KVFTTFPANG	MSDSSTWFA	YIVGTHST	EMCRLEWYTL	361
seHAS	TEILNRK	KVFTTFPANG	MSDSSTWFA	YIVGTHST	EMCRLEWYTL	311
spHAS	TEILNRK	KVFTTFPANG	MSDSSTWFA	YIVGTHST	EMCRLEWYTL	310
huHAS	TEILNRK	KVFTTFPANG	MSDSSTWFA	YIVGTHST	EMCRLEWYTL	366
xlHAS	TEILNRK	KVFTTFPANG	MSDSSTWFA	YIVGTHST	EMCRLEWYTL	394
cvHAS	FAAMKHLSG	ILAFECLYO	ITYFFELVYL	ESRIAVEADP	PAQTATVIVS	411
seHAS	KKIHENFFVA	LTILFVSMF	MMLVYSVWF	FVGHVREDFW	LRVLAFVLII	361
spHAS	KKIHENFFVA	LTILFVSMF	MMLVYSVWF	FVGHVREDFW	LRVLAFVLII	360
huHAS	MWIKKX---	LWNTYALIT	GFEFFLIAT	VIQIFYGKI	MNILLFLLY	413
xlHAS	QWIKKX---	LWNTYALIT	GFEFFLIAT	VIQIFYGKI	MNILLFLLY	441
cvHAS	TYVAKKCGY	TSFRKDIRA	TYEV-LSTV	YFFCMHARI	TAMGLMDIG	460
seHAS	FYVALCRKH	YH--LKHFLS	YLSPTQOVL	HLFVLOLKL	YSLFIRNRD	409
spHAS	FYVALCRKH	YH--LKHFLS	YLSPTQOVL	HLFVLOLKL	YSLFIRNRD	408
huHAS	QLVGDKSE-	FASCLRGWV	WVFMSLQVL	YMSLLAKM	FAIARINKAG	462
xlHAS	QIMSFKSI-	TACNLGWTI	KLMSLSML	YNTGLLSKY	FALLINKTG	490
cvHAS	DOZAGGHEP	SVGTVALWA	KQYLIAMW	AAVVGAGVYS	IVHNMFDWN	510
seHAS	DOZAGGHEP	SVGTVALWA	KQYLIAMW	AAVVGAGVYS	IVHNMFDWN	417
spHAS	DOZAGGHEP	SVGTVALWA	KQYLIAMW	AAVVGAGVYS	IVHNMFDWN	419
huHAS	DOZAGGHEP	SVGTVALWA	KQYLIAMW	AAVVGAGVYS	IVHNMFDWN	505
xlHAS	DOZAGGHEP	SVGTVALWA	KQYLIAMW	AAVVGAGVYS	IVHNMFDWN	533
cvHAS	S---LSYR	FALVGIC-ST	IVTIVIVLVV	YTGKITWN	IRALOKELIE	554
seHAS	ES-KOTVLIV	GTALYAC---	---TWMLLT	YV---VLINE	CGREKQOY	546
xlHAS	TEKQKENY-	-KLLYGCVY	WHYHIVAMV	YH---VHVKR	CCR-KRSQTV	577
cvHAS	DRVLYOATTN	AQSV*				566
seHAS	DMVL-----	DV*				552
xlHAS	TLVH-----	DMCV*				588

FIG. 2

【 図 3 】

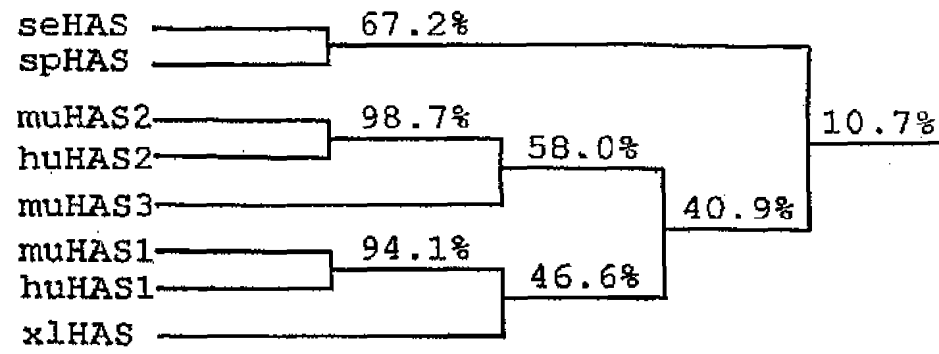
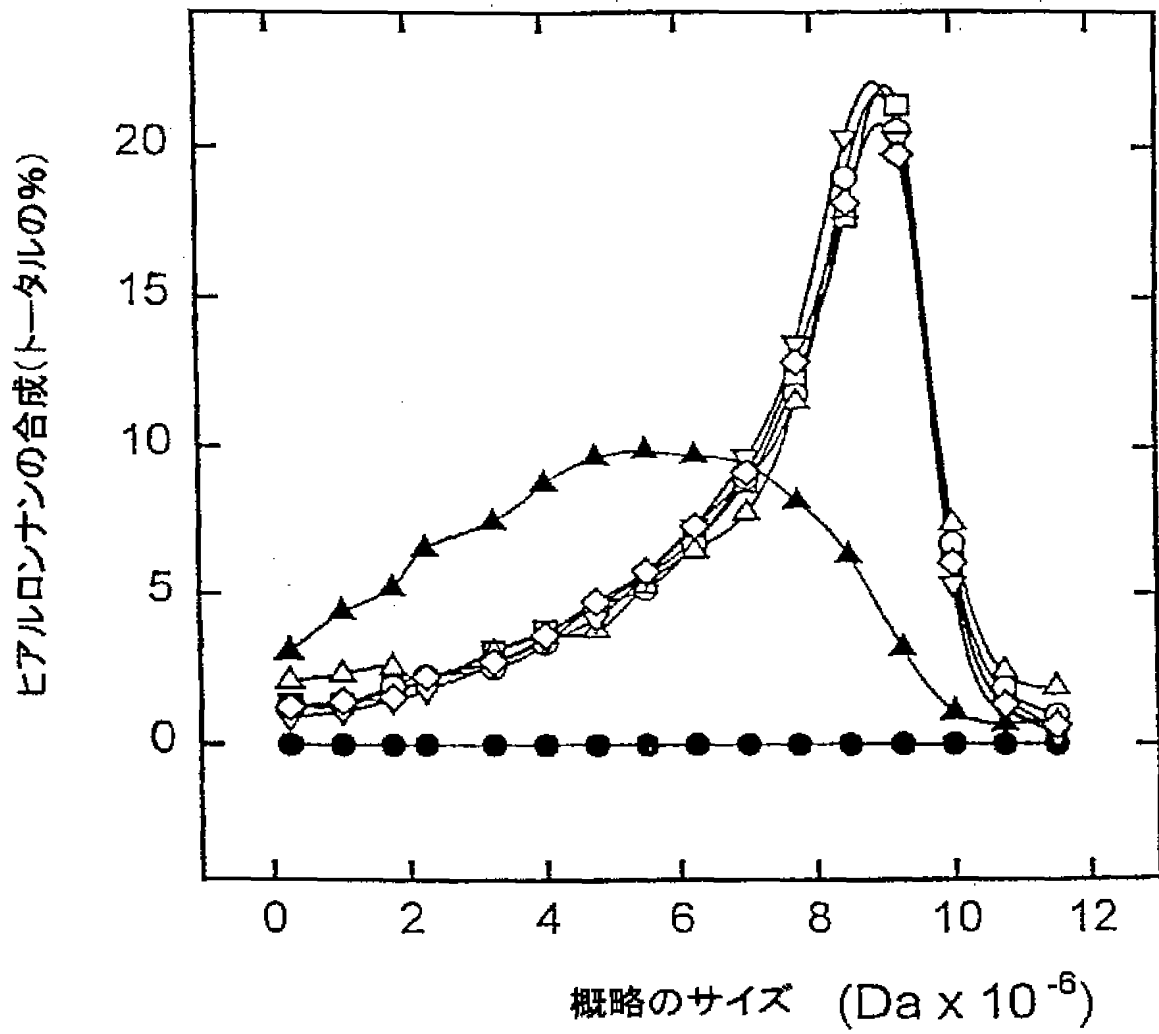


FIG. 3

【 図 4 】

異なる技術のストレプトコッカスHAS酵素により  
産生されたヒアルロンナンのサイズの分布



【 図 5 】

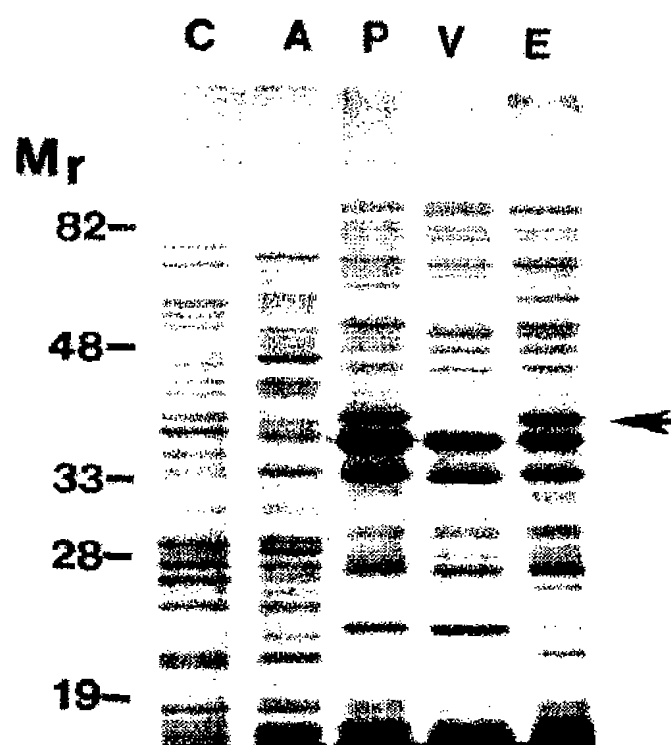


Fig. 5



【 図 6 】

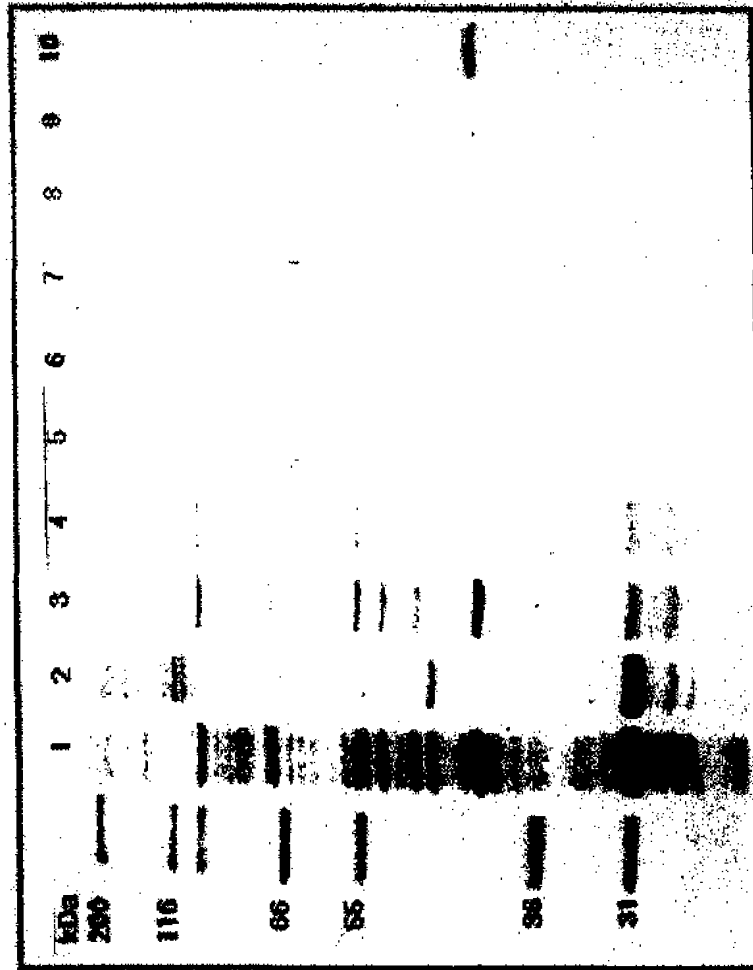
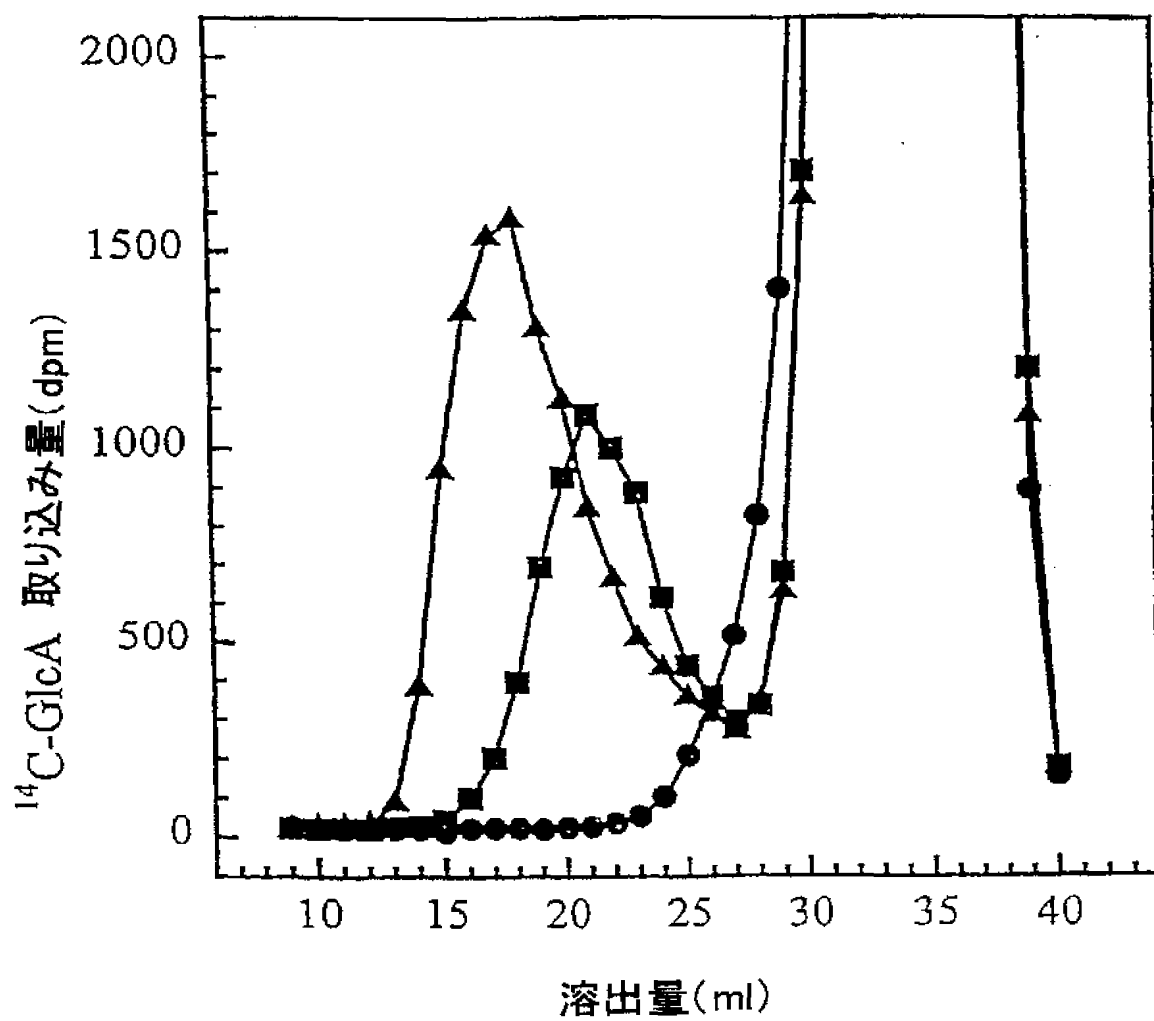


Fig. 6

【 図 7 】



【 図 8 】

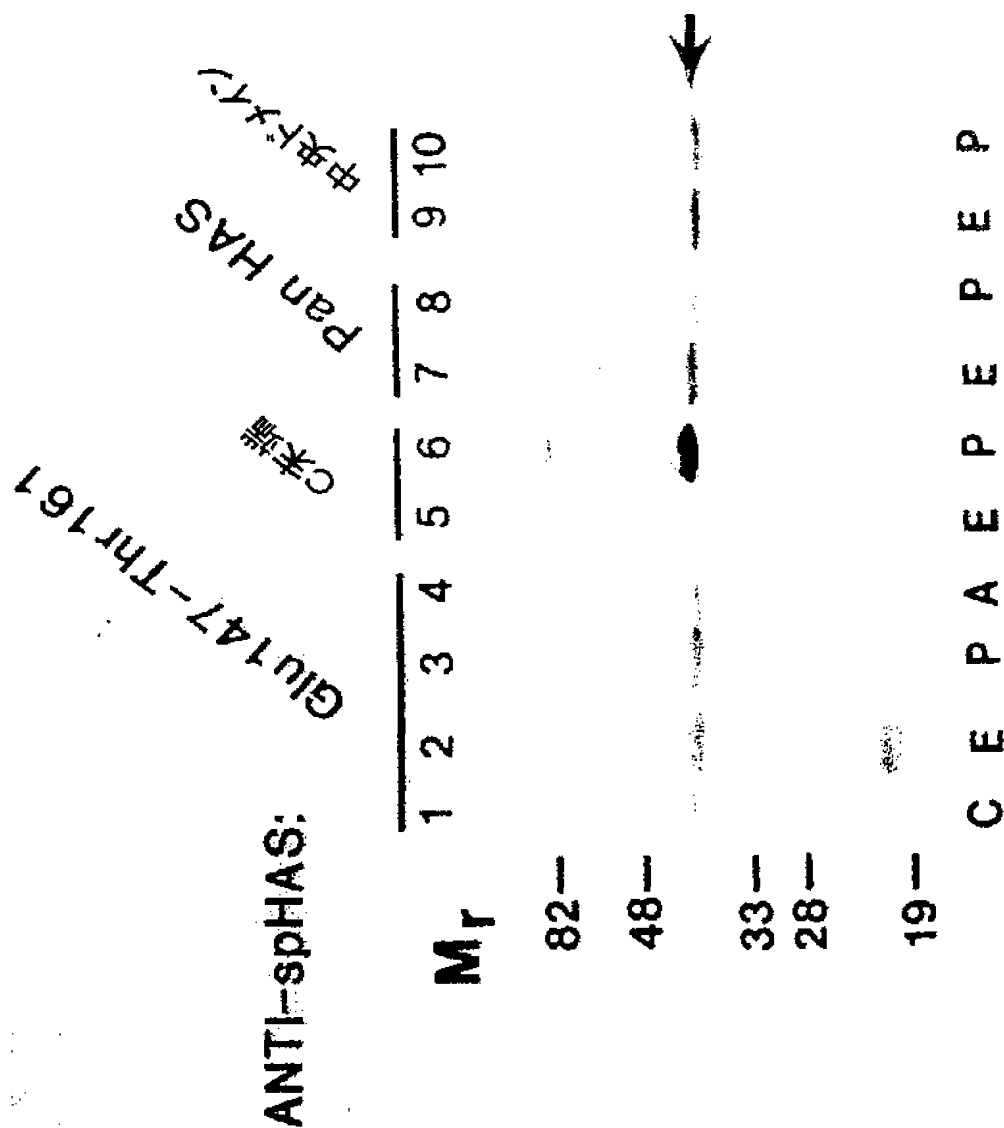
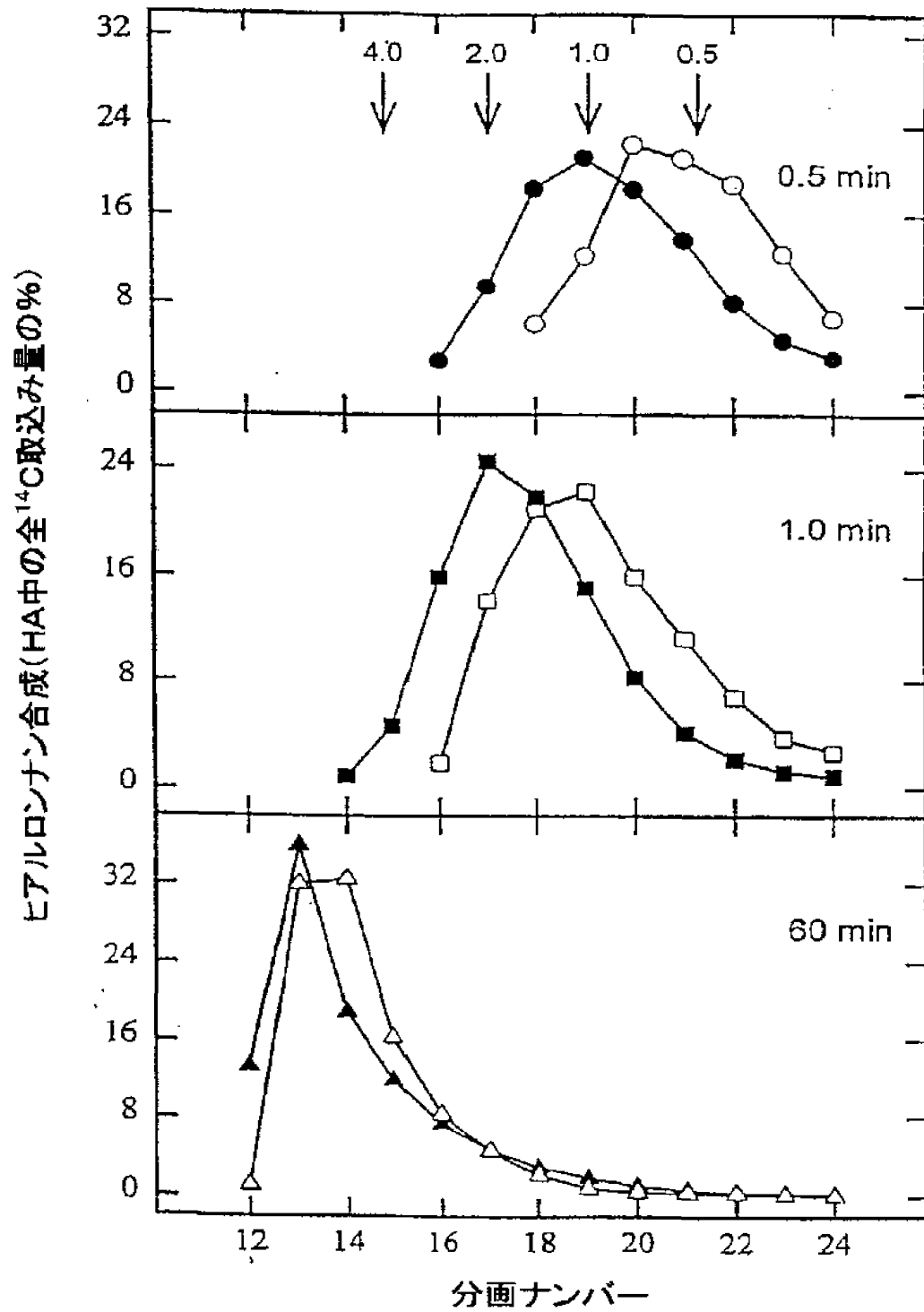
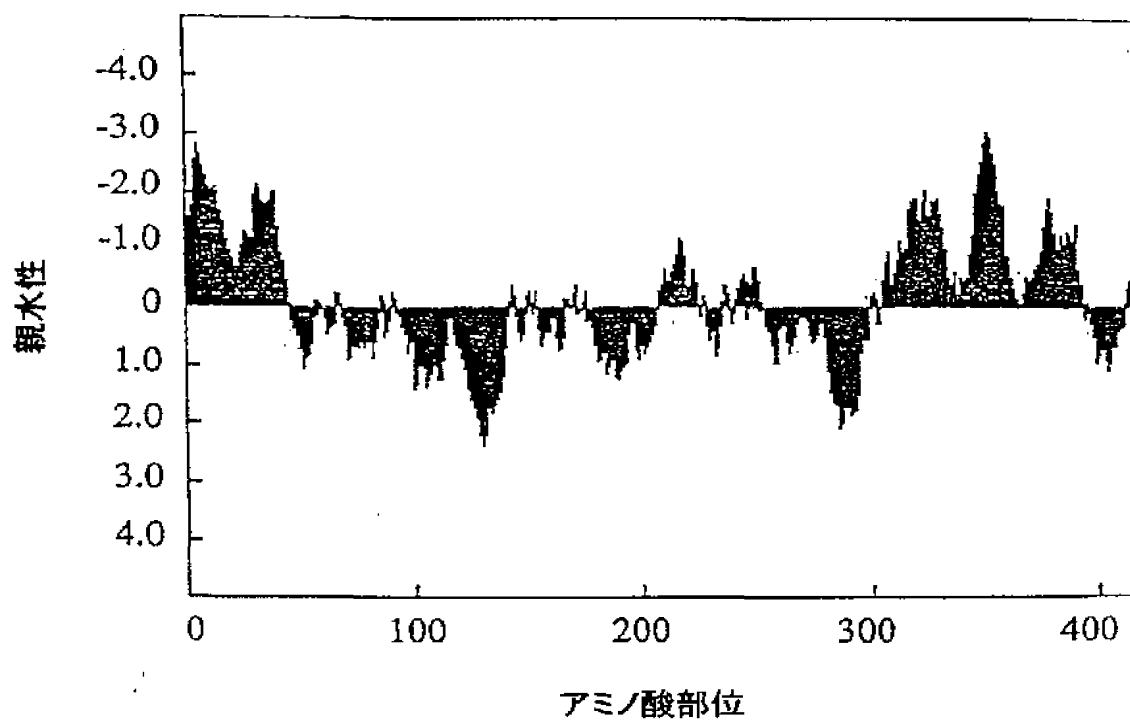


図8

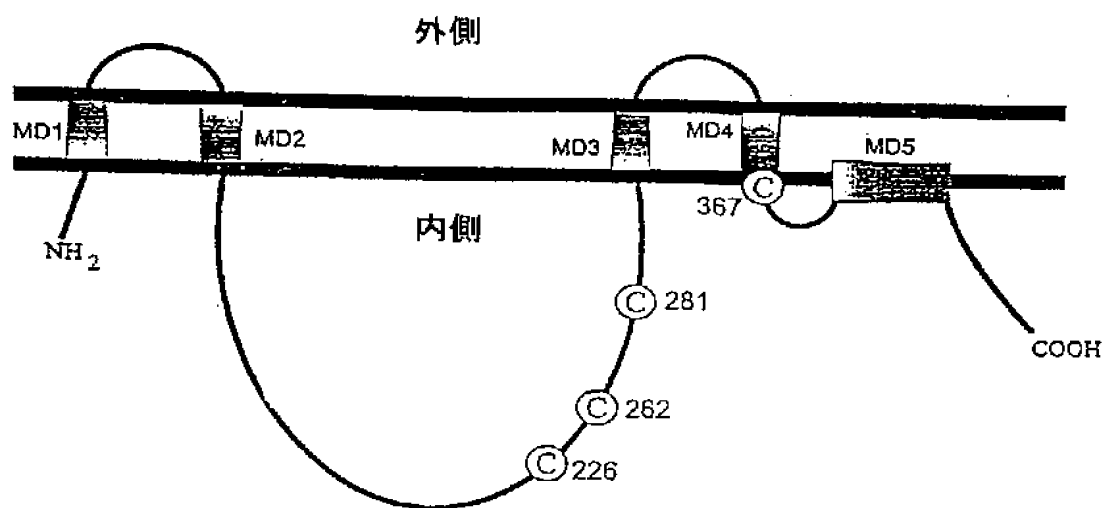
【 図 9 】



【図10】



【図11】



【 図 1 2 】

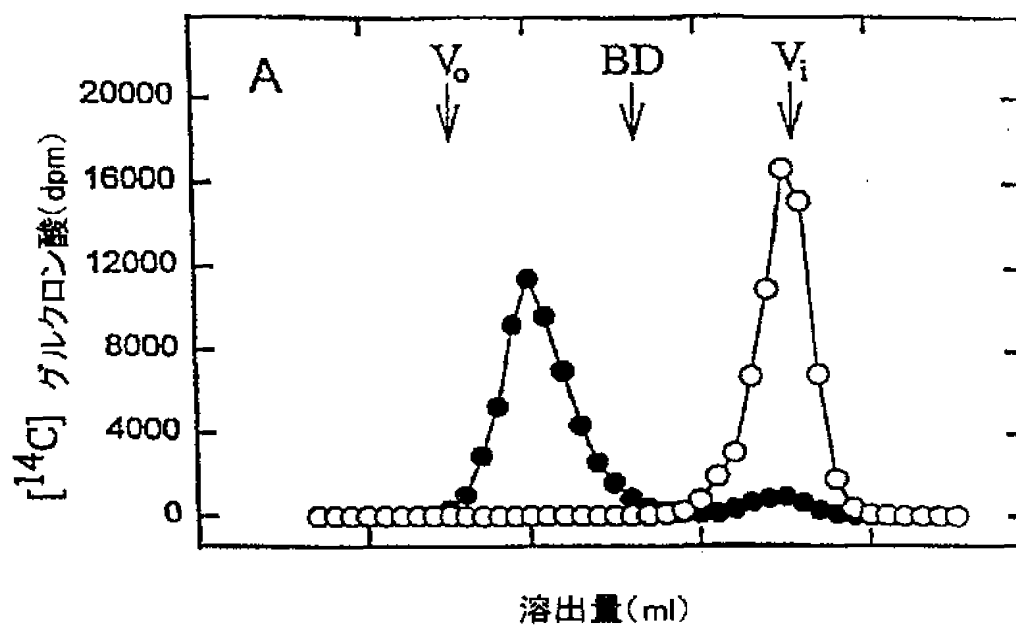


図12A

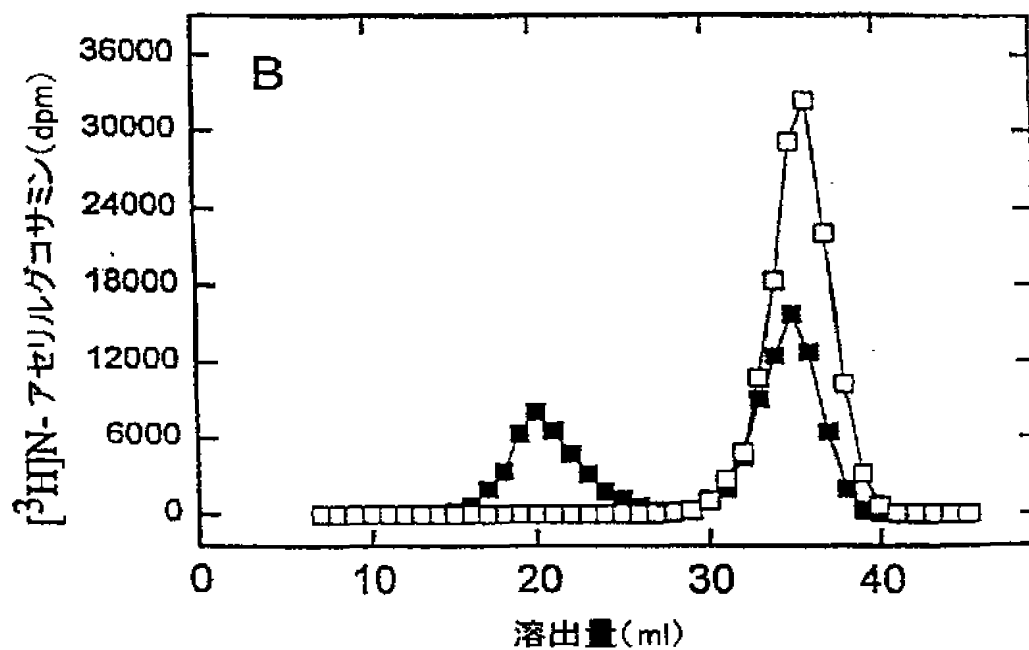


図12B

【 図 1 3 】

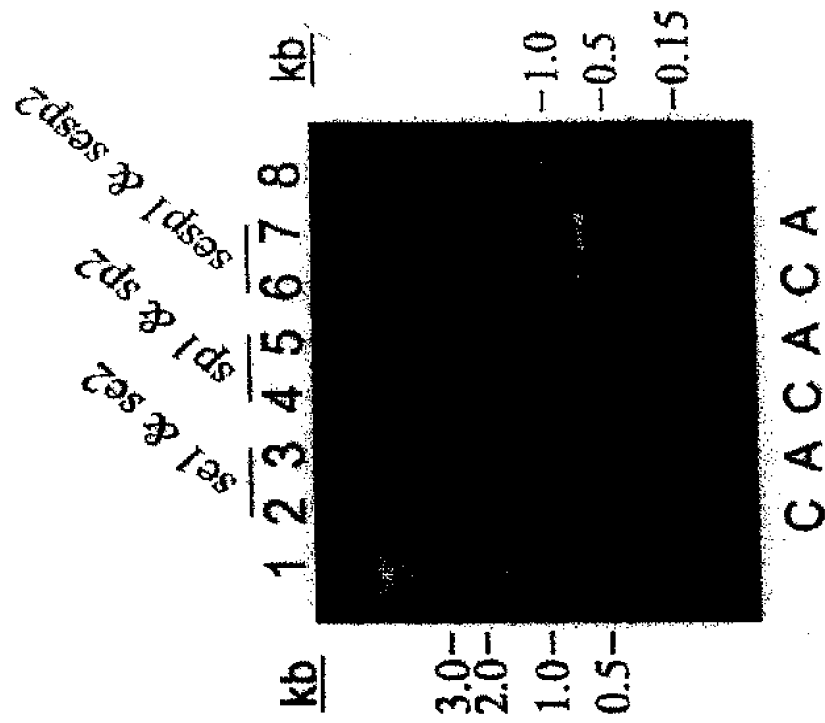


Fig. 13

atgagaacattasaaaaacccataaactgttgtgccccttagtattttttgggtactgttgatttaogtcaat	72
gtttatctcttttgggtgctasaggaagccttgatcaatttatggcctttttgctgatagcttaoactattagtcasa	144
atgtccattatcccttttttacaagocatttaaggggaagggctgggcaataataaggttgacagocattattccc	216
tctttataacgaagatgctgagtcattgtctagagaccttaaaagtgttcagcagcaaaccttatccctagca	288
seq1 →	
gaaatttatgttctgacgatgggaagtcacgacacagcatttataagcgcattgaagactatgtgogtgac	360
actggtgacccatataagcaatgtcattgttccatcggttcagagaaacacaggaagcgtcatgacagggcc	432
seqp1 →	
tgggcccttgaagatcagacgctgatgtctttttgacogtgcactcagatatttatatcaccctgatgct	504
tttagaggagtgtgttaaaaaaccccttaatgacccaactgtttttgtctgcagcgggtcaccttaagtgcagaat	576
agacaaaccaatctcttaacacgcttgacagatattcgctatgataatgctttttggcgttgaaagagctgcc	648
caatccgttacaggttaatatccctgttttgcaggtccgcttagogtttacagagcgcaggtgtgttcttact	720
aaatagatagatacatcaaccagacccctccctgggtattccctgtaagtattggtgatgacaggtgcttgacc	792
aactatgcaactgtatttaggaagactgtttatcaatccactgctaaatgtattacagatgttccctgacaaag	864
atgtctacttacttgaagcagcacaacccgctggaacaagtcctctcttagagagtgcaattatttctgttaag	936
aaantcatgaacaatccctttgtagccctatggaccatacttgagggtgtctatgttttatgatgcttgtttat	1008
← seq2	
totgtgtgtgattttctttgtagcaaaagtcacgaatattgattggctcaggggttttagccctttctgtgtatt	1080
atcttcattgttgcctgtgtcggaacattcattacatgcttaagcaccocgctgctcttctgttatctccg	1152
ttttatggggtgctgcakttgtttgtccctacagcccttgaaattatattctcttttactattagaaatgct	1224
← seq2	
gactggggaacacacgtataaaattattataa	1254

FIG. 14



【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 98/23153	
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N9/10 C12N15/54 C12N15/70 C12Q1/68 A61K31/715 C12P21/00 C12P19/04	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are indicated in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	WO 94 00463 A (MURST ITALIAN ;PREHM PETER (DE); REGAN MICHAEL O (IT); CALLEGARO L) 6 January 1994  see the whole document, see Figure 3 ---
X	WO 91 03559 A (UNIV TEXAS) 21 March 1991  see claims 1-10; example 1 --- -/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.	
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "C" earlier documents but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "U" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 11 June 1999	Date of mailing of the international search report 23/06/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patanden 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl Fax: (+31-70) 340-3018	Authorized officer Mateo Rosell, A.M.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor and Application No.  
PCT/US 98/23153

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 20061 A (SCRIPPS RESEARCH INST ;WONG CHI HUEY (US); DELUCA CLAUDIO (IT)) 5 June 1997  see the whole document ---	1,9-11, 35, 39-41, 49,50, 60-71
X	DOUGHERTY B.A. AND DE RIJN I.: "Molecular characterization of hasA from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, 1994, pages 169-175, XP002105369 cited in the application see the whole document ---	1-3,37, 38,50, 54,58,66
X	DEANGELIS P L ET AL: "MOLECULAR CLONING, IDENTIFICATION, AND SEQUENCE OF THE HYALURONAN SYNTHASE GENE FROM GROUP A STREPTOCOCCUS PYOGENES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 26, 15 September 1993, pages 19181-19184, XP002038784 cited in the application see the whole document ---	1-3,37, 38,50, 54,57, 58,66
X	SEMINO C E ET AL: "HOMOLOGS OF THE XENOPUS DEVELOPMENTAL GENE DG42 ARE PRESENT IN ZEBRAFISH AND MOUSE AND ARE INVOLVED IN THE SYNTHESIS OF NOD-LIKE CHITIN OLIGOSACCHARIDES DURING EARLY EMBRYOGENESIS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, no. 10, 14 May 1996, pages 4548-4553, XP002041499 cited in the application see the whole document ---	1-3,37, 38,50, 54,66
A	P. H. WEIGEL ET AL.: "Hyaluronan synthases" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 22, May 1997, pages 13997-14000, XP002105370 see the whole document and specially Fig.2 ---	1
P,X	WO 98 00551 A (MAYO FOUNDATION ;MCDONALD JOHN A (US); SPICER ANDREW P (US); AUGUS) 8 January 1998  see the whole document ---	1,6, 9-11, 14-17, 20-23, 35,44, 49,50, 60-71

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 98/23153

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>KUMARI K. AND WEIGEL P. H.: "Molecular cloning, expression, and characterization of the authentic hyaluronan synthase from group C Streptococcus equisimilis." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 51, 19 December 1998, XP002105371</p> <p>see the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1-3, 6-14, 17-20, 24, 25, 30, 31, 35-38, 48-71</p>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

 Inter-  
 national Application No.  
 PCT/US 98/23153

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9400463 A	06-01-1994	IT 1260153 B	28-03-1996
WO 9103559 A	21-03-1991	US 5015577 A	14-05-1991
		AU 6342990 A	08-04-1991
WO 9720061 A	05-06-1997	NONE	
WO 9800551 A	08-01-1998	AU 3652297 A	21-01-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) July 1992

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 P 19/04		C 1 2 Q 1/68	A 4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 R 1:46)	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:46)		C 1 2 R 1:46)	
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW		
(71) 出願人	1000 Asp Avenue, Norman, Oklahoma 73019, United States of America		
(72) 発明者	クマリ, クシャマ アメリカ合衆国, 73120 オクラホマ州, オクラホマ シティ, フェザーストウン ロード 2609, アパートメント 467		
(72) 発明者	デアンジェリス, ボウル アメリカ合衆国, 73034 オクラホマ州, エドモンド, サニーブルック ドライヴ 706		
F ターム (参考)	4B024 AA01 AA11 BA07 BA80 CA01 DA06 EA02 EA03 EA04 EA06 GA11 HA12 HA20 4B050 CC03 DD02 LL01 LL03 LL05 4B063 QA01 QA19 QQ21 QQ44 QR08 QR33 QR42 QR56 QS25 QS34 QX02 4B064 AF17 CA02 CA19 CA21 CC24 DA01 DA13 4B065 AA26Y AA49Y AB01 BA02 CA19 CA27 CA44 CA46 4C086 AA01 AA04 EA24 MA02 NA05 ZB07		